



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Vitor da Rocha Sperotto

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Prototheca* spp., ISOLADAS DE LEITE BOVINO, AOS ÓLEOS ESSENCIAIS, AOS PEPTÍDEOS E FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

Santa Maria, RS
2021

Vitor da Rocha Sperotto

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Prototheca* spp., ISOLADAS DE LEITE BOVINO, AOS ÓLEOS ESSENCIAIS, AOS PEPTÍDEOS E FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

Tese apresentada ao curso de Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Doutor Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS
2021

Sperotto, Vitor da Rocha
SUSCETIBILIDADE IN VITRO DE Prototheca spp., ISOLADAS
DE LEITE BOVINO, AOS ÓLEOS ESSENCIAIS, AOS PEPTÍDEOS E
FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS / Vitor da Rocha Sperotto.-
2021.
69 p.; 30 cm

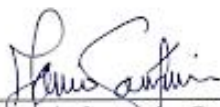
Orientador: Janio Morais Santurio
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2021

1. Antimicrobianos 2. Algicida 3. Prototheca spp 4.
Peptídeos antimicrobianos I. Morais Santurio, Janio II.
Título.

Vitor da Rocha Sperotto

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Prototheca* spp., ISOLADAS DE
LEITE BOVINO, AOS ÓLEOS ESSENCIAIS, AOS PEPTÍDEOS E
FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada ao PPG em
Farmacologia, da Universidade Federal
de Santa Maria (UFSM, RS) como
requisito parcial para obtenção do título
de **Doutor em Farmacologia**.



Janio Moraes Santurio, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Erico Silva de Loreto, Dr. (SOBRESP)



Sônia de Avila Botton, Dr. (UFSM)



Régis Adriel Zanette, Dr. (UFRGS)



Juliana Simoni Moraes Tondolo, Dr. (SOBRESP)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio e compreensão nas horas mais difíceis e por ser a minha maior fonte motivadora.

Agradeço muito ao meu orientador prof. Janio Moraes Santurio, por ter confiado e me dado a oportunidade de continuar estudando.

Um agradecimento em especial a Francielli Pantella Kunz de Jesus, a Carla Weiblen e a Laura Bedin Denardi pelo auxílio e a prestimosidade durante as distintas fases dos experimentos.

Agradeço a oportunidade de aperfeiçoamento ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria e a CAPES.

Agradeço a Universidade de Cruz Alta pelo incentivo a qualificação de professores.

Agradeço aos meus colegas de Unicruz, pelo apoio na realização deste trabalho, os professores Elbio Nallen Jorgens, Aline Alves da Silva e Cristina Krauspenhar.

Agradeço a todos aqueles que de maneira direta ou indireta, colaboraram na realização deste trabalho.

RESUMO

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Prototheca* spp., ISOLADAS DE LEITE BOVINO, AOS ÓLEOS ESSENCIAIS, AOS PEPTÍDEOS E FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

AUTOR: Vitor da Rocha Sperotto
ORIENTADOR: Janio Morais Santurio

Algas aclorofiladas do gênero *Prototheca* são agentes causadores de doenças em humanos e animais. A espécie *Prototheca zopfii* (genótipo 2), com recente reclassificação sugerida para *P. bovis*, é citada por diversos autores como a espécie mais patogênica para os animais, principalmente na forma de mastites bovinas. As infecções são de difícil controle devido à alta capacidade de resistência do agente, determinando prejuízos ao produtor e risco a saúde humana. Na busca de alternativas para o controle da prototecose animal, neste estudo foram testados diversos fármacos de diferentes naturezas. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima *in vitro* de antibacterianos, antifúngicos, óleos essenciais, monoterpenos, terpenos e peptídeos antimicrobianos, contra isolados de *P. spp.* A metodologia dos testes foi a microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 / CLSI. Para realização dos testes foram obtidos isolados de *P. spp.*, a partir de amostras de leite, de propriedades rurais da região noroeste, do Estado do Rio Grande do Sul. A identificação do agente foi por técnica de observação de morfologia de colônia, em cultura e micromorfologia de esporângios, com a visualização da presença de endosporulação. Para identificação das espécies foi utilizada o ensaio de PCR 18S rDNA específico do genótipo. Foram encontrados 32 isolados de *Prototheca* spp., com base em análises genéticas, todos os isolados foram caracterizados como *P. zopfii* (genótipo 2) sendo fragmento de 450 pb do controle de amplificação interna e amplicon específico do genótipo 2 (165 pb), detectável para todos eles. Nos testes foram observadas resistência a todos os medicamentos antibacterianos e óleos essenciais, os monoterpenos e terpenos com atividade inibitória quase ausente. Entre os antifúngicos a anfotericina B (CIM 0,5 a 32 µg/mL; média geométrica: 4,0 µg/mL) e a terbinafina (CIM 0,5 a 128 µg/mL; média geométrica: 3,1 µg/mL) foram os que mais se destacaram assim como o cetoconazol e itraconazol. Os peptídeos antimicrobianos são uma nova classe de fármacos com atividade antimicrobiana, onde os destaques foram para o pexiganan com CIM variando de 5,0 a 10 µg/mL, além de produzir efeito algicida com 5,0 a 20 µg/mL. A CIM do h-Lf1-11 foi de 10 a 80 µg/mL, já o LL-37 teve CIM variando de 20 a 80 µg/mL, e 40 a 160 µg/mL foi o CIM do cecropin B. De maneira geral os resultados mostraram a presença do agente em uma das mais importantes regiões produtoras de leite do Brasil, assim como novas opções de fármacos contra *P. zopfii* (genótipo 2).

Palavras chave: alga, zoonose, mastite bovina, peptídeos antimicrobianos, terbinafina.

ABSTRACT

IN VITRO SUSCETIBILITY OF *Prototheca* spp., ISOLATED FROM BOVINE MILK, TO ESSENTIAL OILS, PEPTIDES AND ANTIMICROBIAL DRUGS

AUTHOR: Vitor da Rocha Sperotto
ADVISOR: Janio Morais Santurio

Alchlorophilic algae of the genus *Prototheca* are disease-causing agents in humans and animals. The species *Prototheca zopfii* (genotype 2), with recent reclassification suggested for *P. bovis*, is cited by several authors as the most pathogenic species for animals, mainly in the form of bovine mastitis. Infections are difficult to control due to the high resistance capacity of the agent, causing damage to the producer and risk to human health. In the search for alternatives to control animal prototecosis, in this study several drugs of different natures were tested. In this context, the objective of this work was to determine the minimum inhibitory concentration *in vitro* of antibacterial and antifungal, essential oils, monoterpenes, terpenes and antimicrobial peptides, against *P. zopfii* (genotype 2) isolates. The testing methodology was broth microdilution, according to CLSI document M27-A3. To carry out the tests, *Prototheca* spp. isolates were obtained from milk samples, from rural properties in the northwest region, in the State of Rio Grande do Sul. The agent was identified by colony morphology observation technique, in culture and sporangia micromorphology, with visualization of the presence of endosporulation. For species identification, the genotype-specific PCR 18S rDNA assay was used. Thirty-two isolates of *Prototheca* spp. were found, based on genetic analysis, all isolates were characterized as *P. zopfii* (genotype 2) being a 450 bp fragment from the internal amplification control and specific amplicon of genotype 2 (165 bp), detectable for all of them. In the tests, resistance to all antibacterial drugs and essential oils, monoterpenes and terpenes with almost absent inhibitory activity, were observed. Among antifungals, amphotericin B (MIC 0,5 to 32 µg/mL; geometric mean: 4,0 µg/mL) and terbinafine (MIC 0,5 to 128 µg/mL; geometric mean: 3,1 µg/mL) were the ones that stood out as well as ketoconazole and itraconazole. Antimicrobial peptides are a new class of drugs with antimicrobial activity, where the highlights were for pexiganan with MIC range from 5,0 to 10 µg/mL, in addition to producing algaecide effect with 5,0 to 20 µg/mL. The MIC produced by h-Lf1-11 was 10 to 80 µg/mL, whereas LL-37 had MIC range from 20 to 80 µg/mL and 40 to 160 µg/mL was the MIC of cecropin B. In general, the results showed the presence of the agent in one of the most important milk-producing regions in Brazil, as well as new drug options against *P. zopfii* (genotype 2).

Key-words: algae, zoonosis, bovine mastitis, antimicrobial peptides, terbinafine.

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Esporângios de *Prototheca* spp. em forma de “mórula”, com a presença de endósporos. Coloração de lactofenol (1.000x)..... 13

Figura 2 – Características do mecanismo de ação dos PAMs e suas interrelações..... 21

PROTOCOLO EXPERIMENTAL I

Table 1. *In vitro* susceptibility testing of *P. zopfii* (genotype 2) against essential vegetable oils..... 32

Table 2. *In vitro* susceptibility tests of isolates of *Prototheca bovis* against antifungal drugs..... 33

PROTOCOLO EXPERIMENTAL II

Table 1 - Percentage of isolates inhibited for each tested concentration and MIC₅₀ and MIC₉₀ values for antimicrobial peptides (AMP) against *Prototheca bovis*..... 46

Figure 1. Kaplan-Meier survival curves of the different AMPs confronted against *Prototheca bovis* isolates..... 46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1.1	Taxonomia <i>Prototheca</i> spp.....	11
1.1.2	Morfologia e biologia.....	12
1.1.3	Patologia.....	14
1.1.4	Prototecose em animais.....	15
1.1.5	Prototecose em humanos.....	15
1.2	TERAPÊUTICA DA PROTOTECOSE.....	16
1.2.1	Fármacos antifúngicos	17
1.2.2	Fármacos antibacterianos.....	18
1.2.3	Óleos vegetais essenciais.....	19
1.2.4	Peptídeos antimicrobianos.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	DELINEAMENTO METODOLÓGICO.....	24
3.1	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>Prototheca</i> spp.	24
3.2	IDENTIFICAÇÃO DE <i>Prototheca</i> spp.	24
3.3	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	26
3.4	ANALISE ESTATÍSTICA.....	27
4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL I.....	28
5	PROTOCOLO EXPERIMENTAL II.....	39
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL I.....	67
	ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO.....	68

APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada em capítulos, sendo eles INTRODUÇÃO, OBJETIVOS, DELINEAMENTO METODOLÓGICO, PROTOCOLO EXPERIMENTAL I e II, DISCUSSÃO e CONCLUSÃO.

A INTRODUÇÃO apresenta o referencial teórico que contextualiza e embasa esta tese. Nos OBJETIVOS são expostos o objetivo geral deste trabalho, assim como os objetivos específicos. O DELINEAMENTO METODOLÓGICO auxilia na compreensão do estudo desta tese na forma de PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS I e II, que representam os resultados obtidos nos estudos, na forma de manuscritos, conforme normas das revistas publicadas e submetidas.

No capítulo DISCUSSÃO são encontrados comentários dos resultados encontrados nos estudos apresentados nos dois capítulos anteriores. No capítulo CONCLUSÃO são apresentadas as informações obtidas nos ensaios realizados desta tese.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são encontradas no final desta tese e somente são referenciadas as citações dos capítulos INTRODUÇÃO, DELINEAMENTO METODOLÓGICO e DISCUSSÃO.

1 INTRODUÇÃO

A domesticação de animais tem um papel fundamental no desenvolvimento da civilização humana, onde bovinos são associados até os dias atuais, como os principais produtores de leite. A produção de leite de bovinos representa 85% do total produzido no mundo. Existem estimativas que a demanda por lácteos, em países em desenvolvimento, deverá aumentar em 25% até 2025 (FAO, 2013).

A produção de leite de bovinos sempre estará ameaçada pela patologia conhecida como mastite, esta é a principal doença infecciosa do gado bovino leiteiro, sendo determinada por múltiplos fatores. Os principais agentes causadores são as bactérias, entretanto, outros microrganismos como fungos e algas, aparecem com destaque, no processo de infecções (LANGONI et al., 2013).

A alga aclorofilada do gênero *Prototheca* spp. é reconhecida como um importante agente na etiologia da mastite bovina, principalmente a espécie *Prototheca zopfii* (genótipo 2) (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007; BERGEN et al., 2009; CAMBOIN et al., 2010; MILANOV et al., 2016; JAGIELSKI et al. 2019). Esta alga é encontrada em ambientes com muita umidade e presença de matéria orgânica, principalmente em locais de pré e pós ordenha (LANGONI et al., 2013). A presença de um microrganismo ambiental permite que possa ocorrer infecções humanas e animais, assim como a contaminação do leite durante a ordenha (CAMBOIN et al., 2010).

A presença de *Prototheca* spp., com potencial patogênico no leite é muito preocupante, porque possibilita a infecção em humanos, quando consomem o produto ou seus derivados. Outra questão inquietante é o fato de o processo de pasteurização não garantir o controle deste microrganismo no leite (MELVILLE et al., 1999).

O primeiro relato de caso de infecção humana, por *Prototheca* spp., ocorreu na África há mais de 50 anos. As apresentações clínicas em humanos ainda são pouco frequentes e se manifestam nas formas cutâneas, articulares e disseminadas, tanto em pacientes imunocompetentes como imunocomprometidos (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007; MAYORGA et al., 2012).

Em relação à saúde animal, as mastites bovinas causadas pela alga determinam uma patologia refratária ao tratamento, levando ao descarte precoce de animais da produção e assim determinando o aumento de custos (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007). Isto ocorre devido às características de resistência do agente e ao processo inflamatório, onde ambos fatores determinam dificuldade na escolha de terapias (LANGONI et al., 2013; MILANOV et al., 2016).

A ausência de fármacos específicos para o tratamento das infecções causadas por *Prototheca* spp., motiva a pesquisa de possíveis princípios ativos no controle destas infecções. Existem relatos na literatura de testes de atividade antimicrobiana *in vitro* de antifúngicos, antibacterianos, quimioterápicos e óleos essenciais frente à alga, mostrando diferentes respostas, mas, invariavelmente, com baixa atividade (BUZZINI et al., 2008; TORTORANO et al., 2008; CUC et al., 2010; KRUKOWSKI et al., 2013; GRZESIAK et al., 2016, ALVES et al., 2017).

A presente tese está fundamentada em dois artigos, onde são apresentadas informações como a confirmação da presença da espécie *Prototheca zopfii* (genotype 2), em uma das mais importantes regiões produtoras de leite do Brasil, a região Noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Neste trabalho ocorre a ratificação de sua característica multirresistência a diversos fármacos antimicrobianos, assim como a demonstração da possibilidade de que antigos e novos produtos possam ser opções de controle do agente.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Taxonomia *Prototheca* spp.

Desde a primeira descrição por Krüger em 1894, até o trabalho de Pore, em 1985, sempre existiu muita divergência entre os pesquisadores sobre a taxonomia do microrganismo conhecido como *Prototheca*. O gênero foi classificado, com base em sua ultraestrutura, ocorrência de grânulos de plastídios no plasma e seu método de reprodução assexuada, com a

formação de células livres (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007). Adl et al. (2012) sugeriram uma nova reclassificação do gênero *Prototheca*:

Eukaryota

Diaphoretickes

Archaeplastida

Chloroplastida

Chlorophyta

Trebouxiophyceae

Chlorellales

Chlorellaceae

Prototheca

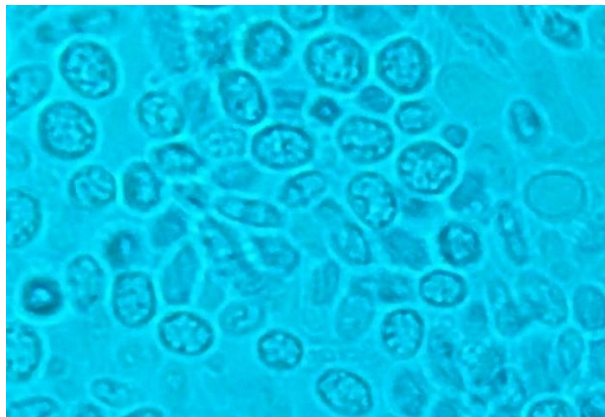
A presença de plastídios ligados à membrana interna das células de *Prototheca* spp., demonstradas por microscopia eletrônica, é um dos argumentos mais importantes na diferenciação entre as algas e os fungos. Estes plastídios diferenciam-se dos que ocorrem em algas verdes, devido à pouca organização de estrutura laminar, parecendo mais cloroplastos vestigiais. Pouco se sabe sobre as funções destas estruturas, mas parecem estar ligadas ao armazenamento de grânulos de amido, sendo outra diferença para os fungos (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007).

O gênero *Prototheca* recentemente recebeu sugestão de uma nova reclassificação de espécies, as quais são propostas: *Prototheca bovis* (*P. zopfii* gen. 2), *Prototheca ciferrii* (*P. zopfii* gen. 1), *Prototheca blascheae*, *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca cutis*, *Prototheca miyajii*, *Prototheca stagnora*, *Prototheca morimorfis* (*P. ulmea*), *Prototheca tumulicola*, *Prototheca cookei*, *Prototheca pringsheimii* e *Prototheca zopfii* (JAGIELSKI et al. 2019). As espécies *P. zopfii* (genotype 2) e *P. wickerhamii* são reconhecidas como as mais patogênicas, e têm sido associadas às infecções no homem e em animais na Europa, na Ásia, na África, na Austrália e nas Américas (CAMBOIN et al., 2010).

1.1.2 Morfologia e biologia

O gênero *Prototheca* é entendido como uma alga aclorofilada, unicelular, não móvel, apresenta reprodução assexuada ocorrendo a formação de esporângios a partir de uma célula livre (IRRGANG, 2016). As formas de esporângios são variadas, podendo ser: esférica, oval, riniforme ou cilíndrica. O tamanho do esporângio é variável entre espécies, dentro das espécies e dentro das cepas, também dependendo de fatores nutricionais, fisiológicos, o número de endósporos e seu estágio de desenvolvimento. No interior do esporângio podem ter de dois a 16, ou mais descendentes. A célula parental se rompe, liberando a prole para repetir o ciclo. São inicialmente uninucleadas, também são encontrados no citoplasma: mitocôndrias, complexo Golgi e vacúolos. A parede celular apresenta uma camada trilaminar externa de esporopolenina e ausência de celulose e quitina (PORE,1985).

Figura 1 – Esporângios de *Prototheca* spp. em forma de “mórula”, com a presença de endósporos. Coloração de lactofenol (1.000x)



Fonte: Autor, 2018.

A esporopolenina é um biopolímero extremamente forte, proporcionando às células uma grande resistência ao estresse mecânico e físico. Dependendo da espécie e dependendo do estágio de desenvolvimento das células, estas podem apresentar uma camada (células jovens), duas ou três camadas. Em alguns casos, a parede celular possui uma cápsula adicional. Em condições ambientais desfavoráveis, elas podem formar células permanentes, que são caracterizadas por uma parede celular muito grossa e rica em gordura. Nesta condição, não ocorre a endosporogênese (IRRGANG, 2016).

A alga aclorofilada *Prototheca* é amplamente distribuída na natureza e tem sido isolada de diversos locais como seiva de árvores, lama, fezes de animais e várias fontes aquosas, incluindo riachos, rios, lagos, água marinha, piscinas e até mesmo de água potável. Estes microrganismos são habitantes onipresentes de esgoto doméstico e raramente são detectadas em sistemas de tratamento de esgoto. As algas também podem ser encontradas em alimentos como: carne bovina e suína, moluscos, caranguejos e leite. Podem ser encontrados de forma transitória na pele humana, unhas, vias respiratórias e sistema digestório. Embora haja uma variedade de outras fontes a partir das quais elas podem ser isoladas, o reservatório principal permanece a água de esgoto e a matéria orgânica (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007).

As algas do gênero *Prototheca* crescem em condições de aerobiose. De acordo com o meio de cultura empregado, o isolamento do microrganismo pode variar entre dois e sete dias, em intervalos de temperatura de 25°C a 37°C. Em Agar Sabouraud formam colônias de tonalidade branca a dourada, entre 1 a 2 mm de diâmetro. Após 72 a 96 horas de incubação, as colônias apresentam diâmetro variável entre 3 e 6 mm e bordas irregularmente onduladas com elevação central (CAMBOIN et al., 2010).

Na cultura em Agar Sabouraud dextrose, ocorre a formação de células semelhantes a leveduras, com colônias brancas e com o odor típico de levedura. São facilmente confundidos com o gênero *Candida*. Por meio de coloração de azul de algodão lactofenol, pode ser realizada a diferenciação microscópica destes dois gêneros, devido à falta de brotamento e a presença de endósporos na alga (IRRGANG, 2016).

1.1.3 Patologia

O gênero *Prototheca* é identificado como agente causador de infecções em humanos e animais, conhecido pelo termo prototecose (ROESLER et al., 2003). A patogenia da prototecose ainda não é totalmente conhecida. Algumas espécies de *Prototheca* podem infectar seres humanos através do contato com fontes potenciais ou por inoculação traumática com a alga, principalmente humanos com deficiência celular (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007).

As espécies causadoras de infecções em animais, principalmente em bovinos leiteiros são: *P. zopfii* (genótipo 2) (*P. bovis*), *P. zopfii* (genótipo 1) (*P. ciferrii*) e *P. blaschae*; em

humanos as infecções ocorrem principalmente pelas espécies: *P. wickerhamii*, *P. cutis* e *P. miyajii* (JAGIELSKI et al. 2019).

A espécie *P. zopfii* (genótipo 2) ocupa um papel significativo na epidemiologia das infecções em animais em todo o mundo, estando associado principalmente com mastite em bovinos, infecções sistêmicas em cães, assim como também pode ocorrer infecções no homem. Sendo assim classificado como o principal agente etiológico global das prototecoses e compreendido como um agente zoonótico. No entanto, a espécie *P. wickerhamii* atua em maior grau nas infecções cutâneas em humanos (AHRHOLDT et al., 2012; TAKANO et al., 2014; GRZESIAK et al., 2016; JAGIELSKI et al., 2017).

1.1.4 Prototecose em animais

A doença nos animais tem ocorrência maior em cães e bovinos. A mastite é a forma predominante de prototecose em vacas, as infecções caninas tendem a ser mais graves, ocorrendo a forma sistêmica, que envolve muitos órgãos internos, principalmente fígado, rins, cérebro e olhos. A prototecose foi documentada em outras espécies, como felinos domésticos, ovinos, peixes e morcegos. As espécies envolvidas são *P. wickerhamii* e *P. zopfii* (genótipo 2), sendo este último o agente causal mais comum (JAGIELSKI; LAGNEAU, 2007).

As mastites bovinas causadas por *Prototheca* spp. são muitas vezes endêmicas, sendo a forma mais relatada (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007). As infecções mamárias se caracterizam por quadros clínicos severos, de alta transmissibilidade nos rebanhos (LANGONI, et al., 2013). A espécie *P. zopfii* (genótipo 2) tem sido diagnosticada como principal agente causador de mastite bovina, levando a perdas severas em rebanhos infectados. Esta alga não responde às terapias de rotina, para controle de mastite, sendo esta antibacterianos e anti-inflamatórios, restando como medida única, até então, a eliminação dos animais infectados (CUC et al., 2010; ALVES et al., 2017), isto se deve ao fato da formação de granulomas mamários (LANGONI et al., 2013).

1.1.5 Prototecose em humanos

O primeiro relato de infecção humana atribuída ao gênero *Prototheca* ocorreu em 1964, em Serra Leoa, África. Ocorreu em um trabalhador rural, que cultivava arroz, o agente foi isolado de uma lesão cutânea crônica, do pé direito. O diagnóstico foi confirmado através de achados histopatológicos e cultura (DAVIES et al., 1964). Recentemente, um número crescente de casos de prototecose humana foram relatados (MASUDA et al., 2016).

A prototecose humana pode apresentar três formas clínicas: a lesão cutânea localizada, considerada a forma mais comum, podendo ocorrer em pacientes imunocompetentes; a articular, manifestada como bursite de olécrano e a disseminada, que afeta pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles com deficiência da imunidade celular. As alterações cutâneas se caracterizam por pápulas, nódulos, eritemas, lesões verrucosas, úlceras, lesões herpetiformes com crostas e descarga purulenta (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007; MAYORGA et al., 2012). Acredita-se que tais lesões sejam causadas por inoculação traumática do agente em tecidos subcutâneos e a sua incidência depende de fatores predisponentes (BOURI et al., 2014).

1.2 TERAPÊUTICA DA PROTOTECOSE

Desde que foi considerada uma zoonose emergente em animais e humanos, a prototecose vem despertando interesse em pesquisadores (CAMBOIN et al., 2010). O aumento de infecções pela alga, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, e de sua natural resistência a agentes antifúngicos, aumentou o interesse científico e comercial na descoberta de novas classes de compostos antimicrobianos (CUC, et al., 2010).

Alguns estudos estão disponíveis em testes de suscetibilidade *in vitro* com espécies de *Prototheca*. Em geral, os testes demonstram que estas são sensíveis à anfotericina B e bastante variável em suscetibilidade a derivados azólicos, como: fluconazol, itraconazol e voriconazol. Também há uma grande variação na suscetibilidade a uma ampla gama de agentes antibacterianos, como tetraciclina, gentamicina e amicacina (LASS-FLÖRL; MAYR, 2007).

Os pesquisadores Todd et al. (2012) realizaram uma grande análise quantitativa da epidemiologia e do tratamento das infecções humanas causadas pela espécie *Prototheca*

wickerhamii. Revisaram 159 casos clínicos da literatura, entre os anos 1964 a 2011, sendo a maioria das infecções na pele. Perceberam que o agravamento das lesões ocorre quando se fez uso de tratamento com esteroides, assim como as deficiências imunológicas foram entendidas como fatores contribuintes. Os fármacos antifúngicos são os que apresentaram as melhores respostas, sendo indicado para terapias iniciais, em pacientes com infecções leves, os azólicos: itraconazol e fluconazol. Para as infecções graves, a anfotericina B é o tratamento de escolha, assim como também para as infecções que falharam no tratamento com os azólicos.

1.2.1 Fármacos antifúngicos

Alguns antifúngicos mostraram eficácia no controle da alga *Prototheca* spp., levando a suposição, de que possam existir algumas semelhanças entre fungos e algas, e que o modo de ação de alguns agentes antifúngicos, possam sobressair-se sobre outros (CHANG et al., 2013). O mecanismo de ação de fármacos antifúngicos é bastante variável, tendo como alvos componentes distintos da membrana celular, outros alteram a síntese da parede celular ou do DNA (BRUNTON et al., 2010).

Em estudo *in vitro*, Marques, et al. (2006), confrontaram a suscetibilidade de isolados bovinos de *Prototheca wickerhamii* e *P. zopfii* (genótipo 2) a dois antifúngicos poliênicos: anfotericina B e nistatina, utilizando métodos de macrodiluição e difusão em ágar. A nistatina mostrou maior eficácia do que a anfotericina B, na inibição do crescimento de *P. wickerhamii*. A inibição do crescimento de *P. zopfii* (genótipo 2) foi semelhante para ambos os agentes antifúngicos.

Em outro estudo Jagielski et al. (2012) trabalharam com mais de uma centena de isolados de *P. zopfii* (genótipo 2) e *P. blaschkeae*, a partir de leite de vacas com mastite, a metodologia utilizada nos testes *in vitro* foi o Etest. Os isolados foram confrontados contra dez antifúngicos, onde a anfotericina B e alguns azólicos apresentaram atividade, mas sendo o primeiro o de menor concentração inibitória mínima (CIM).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico de amplo espectro, muito utilizado em infecções fúngicas sistêmicas, principalmente nas potencialmente fatais (BRUNTON et al., 2010). A atividade antifúngica ocorre pela ligação irreversível ao ergosterol da membrana

fúngica, promovendo poros e alterando a permeabilidade, com consequente extravasamento de ions K^+ e Mg^{2+} (SPINOSA et al., 2014). Outro antifúngico da classe dos poliênicos é a nistatina, com o mesmo mecanismo de ação, mas somente para uso tópico (BRUNTON et al., 2010).

Os antifúngicos azólicos consistem nos imidazólicos e triazólicos, apresentam o mesmo espectro de atividade. O mecanismo de ação é comum a todos, onde inibem a 14- α -esterol desmetilase, inibindo assim a desmetilação do lanosterol (BRUNTON et al., 2010; SPINOSA et al., 2014). Esta enzima é uma CYP microsossômica essencial à biossíntese do ergosterol. Promovem alterações na membrana e assim comprometem as funções de enzimas ligadas a esta, resultando em inibição de crescimento fúngico. Sendo os principais imidazólicos: clotrimazol, miconazol e cetoconazol; e os triazólicos principais: itraconazol e fluconazol (BRUNTON et al., 2010).

Existem outros grupos de antifúngicos como as alilaminas, sendo o principal representante a terbinafina, muito utilizada para o tratamento da dermatofitose. Esta possui ação *in vitro* e *in vivo*, frente a fungos responsáveis por micoses superficiais e sistêmicas (MEINERZ et al., 2007). A terbinafina é uma alilamina sintética, que possui ação inibitória sobre a enzima esqualeno epoxidase e assim bloqueia a biossíntese do ergosterol da membrana fúngica (BRUNTON et al., 2010). Além disso ocorre toxicidade para o fungo com o acúmulo do esqualeno no interior da célula (SPINOSA et al., 2014).

A terbinafina possui particularidades relacionadas ao mecanismo de ação dos triazólicos. Ambos antifúngicos agem inibindo enzimas envolvidas com a síntese do ergosterol, porém a terbinafina parece ter uma vantagem, pois atua mais precocemente na cadeia da biossíntese, tendo um efeito primário fungicida, enquanto o itraconazol provoca a inibição de enzimas dependentes do citocromo P-450, obtendo efeito primariamente fungistático (MEINERZ et al., 2007).

1.2.2 Fármacos antibacterianos

As infecções causadas pela alga vêm aumentando em todo o mundo, o que pode representar um problema sério devido à resistência inerente dessas microalgas a diferentes fármacos. Vários estudos mostraram que os isolados de *Prototheca* spp. são resistentes aos

antibióticos convencionais (MORANDI et al., 2016). A gentamicina foi um dos poucos fármacos antibacterianos com alguma atividade contra a alga em testes *in vitro* (SHAHAN; PORE, 1991; CHANG et al., 2013).

A gentamicina e a tetraciclina foram os fármacos antibacterianos que apresentaram atividade contra 46 isolados de *Prototheca* spp., em um estudo conduzido por Morandi et al., (2016). Foram utilizados nestes testes *in vitro*, 28 diferentes princípios ativos, com a metodologia de disco difusão.

Em outro estudo, Shahid et al. (2016) encontraram pouca atividade da gentamicina contra isolados de *Prototheca zopfii* (genótipo 2), menos de 20% dos isolados apresentaram sensibilidade. Neste mesmo teste a estreptomicina, um outro aminoglicosídeo, apresentou atividade a quase 60% dos isolados. A técnica utilizada foi a de disco difusão, nos testes *in vitro*.

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas indicados para infecções causadas por bactérias Gram negativas. O mecanismo de ação está relacionado com a interferência na síntese proteica, devido à ligação à subunidade 30 S do ribossomo. Ocorrendo interferência em vários mecanismos no processo de translação do RNA mensageiro e assim gerando proteínas defeituosas. Os principais aminoglicosídeos são: neomicina, gentamicina, estreptomicina (SPINOSA et al., 2014) e a paromomicina (BRUNTON et al., 2010).

As tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos, que possuem na sua estrutura química quatro anéis. Possuem largo espectro atuando em bactérias Gram positivas e negativas, micoplasmas, clamídias, riquetsias e protozoários. O mecanismo de ação destes fármacos é a inibição de síntese proteica, ligando-se de forma reversiva a subunidade 30 S do ribossomo e assim impedem a ligação do RNA transportador ao ribossomo (SPINOSA et al., 2014).

1.2.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais são reconhecidamente como fontes potenciais de antimicrobianos e são sempre uma alternativa para os fármacos convencionais. Vários trabalhos registraram os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais extraídos de várias espécies de plantas (TORTORANO et al., 2008).

Os óleos essenciais nada mais são do que uma mistura complexa de muitos compostos bioativos diferentes. Estudos são cada vez mais comuns por pesquisadores devido ao seu potencial terapêutico, semelhante ao de alguns agentes antimicrobianos clássicos. As principais atividades terapêuticas desses produtos naturais são relatadas como anti-inflamatórias, descongestionantes, imunomodulantes, antimicrobianos, antimicóticos, antivirais e antioxidantes (BOURI et al., 2014).

Cuc et al. (2010) confrontaram óleos essenciais contra dez isolados de *P. bovis*, de amostras de leite mastítico e uma cepa da espécie *P. wickerhamii*, submetidos a testes de suscetibilidade por método difusão em ágar. Os óleos essenciais foram das plantas: *Abies alba*, *Saturenja hortensis*, *Mentha piperita*, *Melaleuca alternifolia* e *Oreganum compactum*. A espécie *P. wickerhamii* foi sensível a todos os produtos naturais. Para os isolados de *P. bovis*, a sensibilidade foi para os óleos *Saturenja hortensis*, *Mentha piperita*, *Melaleuca alternifolia*.

Em um estudo de suscetibilidade com antifúngicos e óleos essenciais Tortorano et al., (2008) confrontaram 27 isolados de *P. zopfii* (genótipo 2) e um de *Prototheca wickerhamii*. O ensaio foi de microdiluição em caldo seguindo as diretrizes do CLSI para leveduras. Os óleos essenciais utilizados foram de *Melaleuca alternifolia* e de *Citrus bergamia*, estes exerceram uma atividade inibitória contra alga.

Em um estudo experimental de prototecose cutânea, em camundongos, Bouri et al. (2014) compararam dois tratamentos com óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Saturenja hortensis* e observaram eficiência de ambos. Os parâmetros utilizados foram: redução de sinais clínicos, redução de grau de inflamação e fibrose em comparação com animais não tratados.

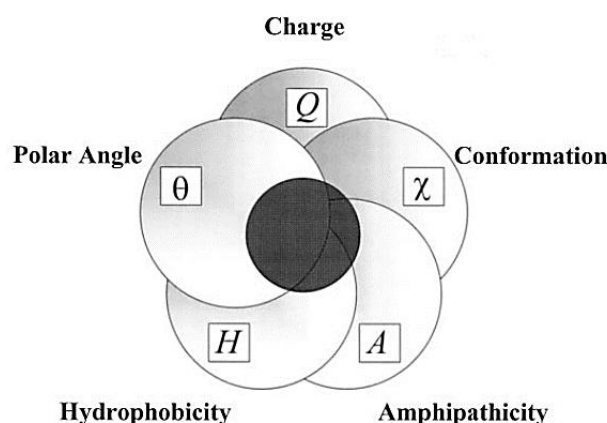
1.2.4 Peptídeos antimicrobianos

Uma nova geração de antimicrobianos, conhecidos como peptídeos antimicrobianos (PAMs), vem apresentando bons resultados contra microrganismos multirresistentes (TÉLLEZ; CASTAÑO-OSORIO, 2014; EBBENSGAARD, et al., 2015; KANG, et al., 2017; CIANDRINI, et al., 2018). PAMs são pequenas sequências de aminoácidos produzidos e isolados de microrganismos unicelulares e multicelulares, como invertebrados, plantas, anfíbios, pássaros, peixes e mamíferos (JENSSEN, et al., 2006; PATEL & AKHTAR, 2017). São importantes na defesa de organismos contra patógenos, participando diretamente da defesa

inata e provavelmente adquirida (DIAMOND, et al., 2009; PHOENIX, et al., 2013). Os peptídeos antimicrobianos têm um amplo espectro de atividades antimicrobianas contra bactérias, leveduras, fungos e vírus (KANG, et al., 2017).

As características estruturais dos PAMs são determinantes para a sua atividade, onde a combinação e as inter-relações dessas estruturas permitem a ação biológica contra os microrganismos (YEAMAN & YOUNT, 2003). Os mecanismos de ação da atividade biológica dos PAMs podem ser divididos em duas classes: os disruptivos de membrana, que promovem a permeabilidade da membrana, e os disruptivos não membrana, que atuam em alvos intracelulares (LEE, et al., 2016). As principais características atribuídas ao seu mecanismo de ação seletiva nas membranas e estruturas internas dos microrganismos são: conformação, carga, caráter hidrofóbico, anfipaticidade e estrutura secundária (Figura 2) (KANG et al., 2017).

Figura 2 – Características do mecanismo de ação dos PAMs e suas inter-relações.



Fonte: Yeaman & Yount, 2003.

Pexiganan ou MSI-78 (GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK-NH₂) é um peptídeo de 22 aminoácidos com um peso molecular de 2,4 kDa, que foi isolado de pele de rã por *Xenopus laevis* (NESHANI et al. 2018). É um AMP α -helicoidal, análogo da magainina-2, já com formulação aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA), na forma de creme a 0,8%, para o tratamento de infecções leves em lesões de pés, de pacientes diabéticos. Também pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções bacterianas agudas da pele, incluindo úlceras

de decúbito infectadas, feridas cirúrgicas, queimaduras e colonização nasal de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (KANG et al. 2017).

Estudos demonstraram efeito antibacteriano de amplo espectro do pexiganan, quando testado contra bactérias, tanto para Gram-positivas como Gram-negativas (FLAMM et al. 2015). O mecanismo de ação do pexiganan contra bactérias é através do rompimento de membranas, formando poros toroidais, devido ao arranjo α -helicoidal anfipático, permitindo assim a inserção de um setor hidrofóbico bem definido na bicamada lipídica e levando ao desequilíbrio hidroeletrolítico da célula microbiana (MONTEIRO et al, 2015).

O hLf1-11 (GRRRRSVQWCA) é um PAM catiônico derivado da lactoferrina humana, conhecido por seus efeitos bactericidas contra MRSA, quando utilizado para o controle de infecção óssea, desinfecção de material de superfície (STALLMAN et al. 2003; COSTA et al. 2014) e efeito antifúngico contra biofilmes produzidos por *Candida albicans* (MORICI et al. 2016). Pesquisas demonstraram que h-Lf1-11 pode penetrar a parede celular e membrana celular, sem destruir sua integridade, além de disso tem capacidade de ligação ao DNA (HUO et al, 2011).

O PAM catiônico cecropin B (KWKIFKKIEKVGRNIRNGIIKAGPAVAVLGEAK AL) é um peptídeo, originalmente encontrado em insetos, como a mariposa *Antheraea pernyi* (WANG et al, 2018). Estudos demonstraram efeito inibitório contra bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa*, mas não é ativo contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*. Sua ação é atribuída, como os outros PAMs, à carga catiônica que pode contribuir para seus contatos eletrostáticos iniciais com partes carregadas negativas da parede celular ou membrana dos microrganismos (WANG et al, 2018; EBBENSGAARD et al, 2015).

O PAM fengicin B (EKYTEVPEYV) é um lipopeptídeo produzido pelo *Bacillus subtilis*, conhecido por desenvolver atividade antifúngica contra fungos filamentosos e pouca atividade contra bactérias e leveduras. O magainin-2 (GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS), é um peptídeo α -helicoidal natural, com boa atividade contra isolados de bactérias e fungos, seu mecanismo de ação é a formação de poro toroidal (IMURA et al, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo avaliar antimicrobianos com potencial inibitório e/ou algicida sobre isolados da alga aclorofilada *Prototheca bovis* em testes *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar a alga aclorofilada *Prototheca* spp. em amostras de leite de propriedades rurais, da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.
- Realizar a caracterização fenotípica e a genotípica das algas isoladas;
- Determinar a CIM de fármacos antibacterianos contra *P. zopfii* (genótipo 2);
- Determinar a CIM de fármacos antifúngicos contra *P. zopfii* (genótipo 2);
- Determinar a CIM de óleos essenciais contra *P. zopfii* (genótipo 2);
- Determinar CIM de peptídeos antimicrobianos contra *P. zopfii* (genótipo 2);

3 DELINEAMENTO METODOLÓGICO

3.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE *Prototheca* spp.

As algas do gênero *Prototheca* spp. utilizadas no estudo foram obtidas após isolamento de amostras de leite de tanques de resfriamento, de produtores da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Foram realizadas 94 coletas de amostras de leite, de propriedades rurais situadas nos municípios: Alpestre, Arroio do Tigre, Campinas das Missões, Cândido Godoi, Catuípe, Condor, Constantina, Cruz Alta, Doutor Maurício Cardoso, Espumoso, Fortaleza dos Valos, Giruá, Ibirubá, Ijuí, Independência, Nova Candelária, Novo Machado, Palmeira das Missões, Panambi, Pejuçara, Quinze de Novembro, Rondinha, Salvador das Missões, Santa Rosa, Santo Angelo, Senador Salgado Filho, Três de Maio, Tucunduva, Tuparendi e Ubiretama. O período de coletas de amostras de leite foi entre maio de 2016 e junho de 2017.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DE *Prototheca* spp.

A caracterização fenotípica de *Prototheca* spp. foi de acordo com Roesler *et al.* (2001, 2006). Para o isolamento, cultivo e análises bioquímicas das estirpes de *Prototheca* spp. foi alterada a técnica com a utilização do meio sólido, Agar Sabouraud-dextrose com adição de cloranfenicol (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), para evitar a formação de colônias bacterianas. As culturas foram realizadas em estufa a 32°C, sob condições aeróbias de atmosfera. Para fins de diagnóstico foram coletadas em frascos estéreis identificados, amostras de 10 mL de leite a partir de tanques de resfriamento, em propriedades rurais. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo. Para facilitar o isolamento de *Prototheca* spp., de amostras de leite foi utilizado como pré-cultura, o caldo de enriquecimento para *Prototheca* (MEP), sob agitação, durante 96 horas (PORE *et al.* 1987). Após foram semeadas alíquotas de 100 µl deste pré-cultivo de leite, em placas de Petri com o meio sólido. Entre 72 e 120 h de cultivo, as placas foram examinadas para a presença de colônias de *Prototheca* spp. Foram selecionadas as colônias de coloração branca, que apresentaram diâmetro entre 3 e 6 mm, bordas irregulares, com ondulações e elevação central na superfície. Quaisquer colônias que se assemelharam à alga foram subcultivadas no mesmo meio. Esfregaços de colônias de

interesse foram coradas com azul de lactofenol, e investigadas microscopicamente para a presença de esporângio com endosporulação.

Para a caracterização genotípica de *Prototheca* spp. foi utilizado para extração de DNA genômico o mesmo designado por Jagieski et al., (2017b). Os isolados foram cultivados em ágar YPD (Extrato de Levedura - Peptona - Dextrose) (Merck, São Paulo, Brasil) por 72h. Posteriormente, uma única colônia de cada isolado foi cultivada em 100 mL, de caldo YPD (Merck, São Paulo, Brasil) por 72 horas, a 37°C, com agitação de 200 rpm. Após, 10 mL da cultura foram centrifugados em 4500 rpm em 10 min, e o pellet foi suspenso em 1 mL de Tris-EDTA, este procedimento foi repetido duas vezes, para limpeza do pellet.

O pellet foi finalmente suspenso no mesmo volume utilizado para a limpeza realizada anteriormente. O DNA foi extraído de acordo com o protocolo de Van Burik et al., (1998) com modificações. O sedimento foi colocado em um almofariz pré-resfriado e pilão, tornando-se um pó fino, onde foi suspenso em 600 µL de tampão de extração de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (1% CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris pH 8,0, 20 mM EDTA) (Merck, São Paulo, Brasil) e colocado em um tubo de microcentrífuga de 2 mL, que foi incubado em gelo por 1 hora.

O DNA foi extraído com 600 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico 25: 24: 1 (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). A precipitação do DNA foi realizada com 0,55v de isopropanol (Merck, São Paulo, Brazil). O sedimento obtido foi suspenso em 100 µL de tampão TE RNase A (20mg / mL), centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e as concentrações de DNA foram determinadas por espectrofotometria.

O ensaio de PCR 18S rDNA específico do genótipo foi conduzido conforme descrito anteriormente por Roesler et al., (2006) e Jagielski et al., (2011). Os pares de iniciadores usados em PCRs foram os seguintes: Proto18-4f (5'-GACATGGCGAGGATTGACAGA-3') e PZGT 1 / r (5'-GCCAAGGCCCGAAG-3') para o genótipo 1, Proto18-4f e PZGT 2 / r (5'-GTCGGCGGGGCAAAGC-3') para o genótipo 2, e PZGT 3-IK / f (5'-CAGGGTTCGATTCCGGAGAG-3') e PZGT 3 / r (5'-GTTGGCCCGGCATCGCT-3') para *P. blaschkeae*. Além disso, Proto18-4f e Proto18-4r (5'-AGCACACCCAATCGGTAGGA-3') para os genótipos 1 e 2, e PZGT 3-IK / f e PZGT 3-IK / r (5'-GAATTACCGCGGCTGCTGG-3') para *P. blaschkeae* serviu como controle de amplificação interna.

As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 20 pmol de cada primer, 1,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 200 µM de cada desoxinucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 1X do tampão de enzima 10X e 200 ng de DNA. As condições dos ciclos de PCR foram: 94 ° C / 3 min; 30 ciclos de 94 ° C / 45 s, 58 ° C / 30 s e 72 ° C / 30 s; 72 ° C / 10 min; e 4 ° C / ∞.

Uma alíquota de 10 µl de amplificação por PCR foi submetida à eletroforese em géis de agarose 1%, corada com brometo de etídio e visualizada sob luz ultravioleta. O fragmento de 450 bp do controle de amplificação interno e amplicon específico do genótipo 2 (165 bp) foi detectável para todos eles. As cepas de *Prototheca* foram armazenadas em frascos com solução salina (0,85%), lacrados e mantidos em temperatura ambiente (+/- 25 °C). No momento do uso, as cepas foram reativadas em ágar YPD e incubadas por 72 h a 28 ° C.

3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A suscetibilidade de *P. zopfii* (genótipo 2) aos fármacos antimicrobianos foi avaliada por meio da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo descrito no documento M27-A3 (CLSI, 2008). Este teste foi escolhido considerando a ausência de procedimentos universalmente aceitos ou critérios interpretativos específicos para espécies de *Prototheca*, bem como similaridade nas condições de crescimento de *P. zopfii* (genótipo 2) e leveduras. Para a preparação do inóculo, as cepas foram subcultivadas em meio ágar YPD a 28°C, por 72 hs. e duas a cinco colônias foram coletadas e ressuspensas em solução salina estéril (0,85%). A densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro, para obtenção da absorbância equivalente da escala de McFarland para 0,5 a 530 nm. A suspensão de trabalho foi preparada diluindo 1:50 em solução salina, seguida por uma diluição de 1:20 em meio líquido RPMI-MOPS, resultando em uma concentração de $1-5 \times 10^3$ células / mL (CLSI, 2008).

As placas para os testes de inibição continham 100 µL de cada diluição de antimicrobianos previamente preparados (distribuídos duas vezes) e suas concentrações finais; 100 µL foram adicionados a partir do inóculo previamente padronizado. Os controles de esterilidade (negativo) e crescimento (positivo) estiveram presentes em todos os experimentos. CIMs foram determinados após 48 hs. de incubação a 35°C. Os resultados foram obtidos a partir de leituras visuais baseadas em 100% de inibição / ausência de crescimento em relação ao seu controle positivo (M27-A3, CLSI, 2008).

As concentrações testadas para antifúngicos, antibacterianos e óleos essenciais variaram de 0,5 a 320 µg / mL e os PAMs variaram de 0,125 a 64 µg / mL. As cepas padrão de *Candida albicans* ATCC 90028 foram incluídas como controle interno (CLSI, 2008).

A concentração algicida mínima (CAM) foi determinada da seguinte forma: alíquotas de 20µl coletadas de cada poço que apresentava inibição completa do crescimento e colhidas em placas de SDA. As placas foram incubadas a 28° C até que o crescimento fosse detectado na subcultura controle (48-72h). A CAM foi considerado a menor concentração de droga que resultou na ausência de crescimento (ESPINEL-INGROFF et al., 2002). Todas as experiências foram realizadas em triplicata.

Os fármacos utilizados foram os antibacterianos: estreptomicina, gentamicina, neomicina, paromomicina, tetraciclina, claritromicina, sulfametoxazol, trimetoprima, ampicilina, vancomicina, rifampicina e cefepima; os antifúngicos: nistatina, anfotericina B, terbinafina, clotrimazol, miconazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol; os óleos essenciais vegetais: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), alho (*Allium sativum*), orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), tomilho branco (*Thymus vulgaris*), hortelã (*Mentha spicata*), pimenta preta (*Piper nigrum*), pimenta; os monoterpenos e terpenos: carvacrol, geraniol, citral, eucaliptol, citronelol e timol; cinamaldeído; peptídeos antimicrobianos: h-LF1-11, MSI-78, LL-37, fengycin B, magainin-2 e cecropin B.

3.4 ANALISE ESTATÍSTICA

Ambos os resultados de CIM e CAM obtidos dos testes com os trinta e dois isolados de *P. zopfii* (genótipo 2) foram incluídos nas análises. CIM50 (valor de CIM em que $\geq 50\%$ das cepas foram inibidas) e CIM90 (valor de CIM em que $\geq 90\%$ das cepas foram inibidas) foram determinados usando o Microsoft Excel 2020 (Microsoft Informatica Ltda., São Paulo, Brasil). Para avaliar a diferença entre os CIMs / CAMs obtidos de todos os PAMs, as análises de sobrevivência foram realizadas pelo teste de Wilcoxon em curvas de Kaplan-Meyer usando Origin (Pro) Versão Número 2020b (OrigenLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Quando o valor de p foi menor que 0,05, considerou-se que houve diferença significativa dos efeitos (inibição ou morte celular) em relação à dosagem (CIM/CAM).

4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I

IN VITRO ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF ESSENTIAL OILS AND ANTIFUNGAL DRUGS ON *Prototheca bovis* ISOLATES

Manuscrito submetido ao periódico: *Mycopathologia*¹

¹ Comprovante de submissão no Anexo A

IN VITRO ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF ESSENTIAL OILS AND
ANTIFUNGAL DRUGS ON *Prototheca bovis* ISOLATES

Vitor R. Sperotto*^{1,2}, Carla Weiblen², Francielli P. K. Jesus², Karine B. Schlemmer², Laura B. Denardi¹, Ana C. Sotili³, Sydney H. Alves^{1,2}, Janio M. Santurio^{1,2}

¹Pharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

²Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

³University of Cruz Alta, Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Vitor da Rocha Sperotto

University of Cruz Alta, Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil

Rodovia Municipal Jacob Della Mea, s/n km 5,6 - Parada Benito, Cruz Alta - RS, 98020-290,

Brazil. Tel/Fax: +55 (55) 3321-1500; E-mail: vrocha@unicruz.edu.br

Abstract

The absence of specific drugs for the treatment of algae infections motivates research of active principles in the control of these infections. The objective of this work was to evaluate a greater number of drugs of different natures and biological action in the search for one or more active principles for the control of *Prototheca bovis*. The drugs used were the antibacterials, antifungals, essential oils vegetables, monoterpenes and terpenes. We observed resistance to all antibacterial drugs and essential oils in susceptibility tests *in vitro*. Results were found with the antifungal drugs ketoconazole, itraconazole, amphotericin B (MIC range 0.5 to 32 µg/mL; geometric means: 4.0 µg/mL) and terbinafine (MIC range of 0.5 to 128 µg/mL; geometric means: 3.1 µg/mL), all showed inhibitory activity, highlighting the last two antifungals. We believe that further testing is needed to confirm the therapeutic potential of this terbinafine, so that it may be another therapeutic option against *P. bovis*.

Keywords: bovine mastitis, algae, amphotericin B, azoles, terbinafine.

Introduction

The genus *Prototheca* is identified as the causative agent of infections in humans and animals, known by the term protothecosis [1]. The disease in animals has a higher occurrence in cattle and dogs, where mastitis is a predominant form of protothecosis in cows and as canine infections in the systemic form [2]. Human protothecosis may present three clinical forms: a cutaneous lesion, considered a more common form, a joint, manifested as olecranon and disseminated bursitis, affecting immunocompromised patients [3,4].

The *Prototheca* genus recently added to the new species reclassification, such as: *Prototheca bovis* (*P. zopfii* gen. 2), *Prototheca ciferrii* (*P. zopfii* gen. 1), *Prototheca blascheae*, *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca cutis*, *Prototheca miyajii*, *Prototheca stagnora*, *Prototheca morimorfis* (*P. ulmea*), *Prototheca tumulicola*, *Prototheca cookei* and *Prototheca pringsheimii* [30]. The species *P. bovis* and *P. wickerhamii* are recognized as the most pathogenic, and have been associated with infections in man and animals in Europe, Asia, Africa, Australia and the Americas [8]. Except for the species *P. stagnora* and *P. morimorfis*, all others are recognized as agents causing infections in humans and animals [7].

The pathogenesis of protothecosis is not yet fully understood. Some species of *Prototheca* can infect humans through contact with potential sources or by traumatic inoculation with algae, mainly humans with cell deficiency [3]. The algae achlorophyllous *Prototheca* is widely distributed in nature, has already been isolated from several environments, such as: animal breeding places, food, transient in human skin, nails, respiratory tract and digestive system [2]. The main environments where it is found are usually places with high humidity and the presence of organic matter [9].

The absence of specific drugs for the treatment of infections caused by *Prototheca* spp., motivates the research of active principles in the control of these infections. There are reports in the literature of *in vitro* antimicrobial activity tests of antifungal, antibacterial, chemotherapeutic and essential oils against algae, showing different responses, but invariably with low activity [10-13]. In this way, this study aims to evaluate a greater number of drugs of different natures and biological action, in the search for obtaining one or more active principles, for the control of infections by *Prototheca bovis*.

Materials and methods

A total of 94 samples were collected from milk samples, from bulk tanks, from producers in the Northwest region of the State of Rio Grande do Sul, in thirty different municipalities. For the isolation of the agent, the milk samples were precultured in *Prototheca* enrichment broth (PEB) under agitation, for 96 hours [14]. Subsequently the samples were placed in solid medium on Sabouraud-dextrose agar with addition of chloramphenicol (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). The cultures were harvested at 32°C under aerobic atmosphere conditions. White colonies were selected, with a diameter between 3 and 6 mm, irregular edges, with undulations and central elevation on the surface. Any colonies that resembled algae were subcultured in the same medium. Colonies smears of interest were stained with lactophenol cotton blue and investigated microscopically for the presence of sporangium with endosporulation [15].

Confirmatory identification was performed by molecular analysis. The protocol used for genomic DNA extraction was the same as designated by Jagieski et al. [30]. DNA was extracted according to the protocol of Van Burik et al. [31] with modifications. Genotype-specific PCR 18S rDNA assay was conducted as described previously Roesler et al., [32] and Jagielski et al. [33]. The strains were stored in vials with saline solution (0.85%), sealed and kept at room

temperature (± 25 °C). At the time of use, the strains were reactivated on YPD agar and incubated for 72 h at 28 °C.

The susceptibility of *Prototheca* spp. to the antimicrobial drugs will be evaluated by the broth microdilution technique, according to the protocol described in CLSI M27-A3 [16]. The drugs used were the antibacterials: streptomycin, gentamicin, neomycin, paromomycin, tetracycline, clarithromycin, sulfamethoxazole, trimethoprim, ampicillin, vancomycin, rifampicin and cefiprima; antifungals: nystatin, amphotericin B, terbinafine, clotrimazole, miconazole, ketoconazole, fluconazole and itraconazole; the essential oils: rosemary (*Rosmarinus officinalis*), basil (*Ocimum basilicum*), garlic (*Allium sativum*), oregano (*Origanum vulgare*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), white thyme (*Thymus vulgaris*), mint (*Mentha spicata*), black pepper (*Piper nigrum*); the monoterpenes and terpenes: carvacrol, geraniol, citral, eucalyptol, citronellol and thymol; cinnamaldehyde.

The strains were also evaluated against amphotericin B (Merck, São Paulo, Brazil) as a reference for sensitivity, as described above. The antifungal compound was diluted in DMSO (Merck, São Paulo, Brazil) and then in RPMI – MOPS for working solution. The concentrations tested ranged from 0.5 to 320 $\mu\text{g/mL}$. The standard strains of *Candida albicans* ATCC 90028 were included as an internal control [16].

The minimal algacide concentration (MAC) was determined as follows: 20 μl aliquots were collected from each well that presented complete growth inhibition and harvested onto SDA plates. Plates were incubated at 28°C until growth was detected in the control subculture (48-72h). MAC was considered as the lowest drug concentration that resulted in absence of growth [35]. All experiments were carried out in triplicate.

Statistical Analyses

Analysis of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal algacidal concentration (MAC) results obtained from the thirty-two *P. bovis* strains were included in the analyses. MIC₅₀ (MIC value at which $\geq 50\%$ of the strains were inhibited) and MIC₉₀ (MIC value at which $\geq 90\%$ of the strains were inhibited) were determined using the Microsoft Excel 2020 (Microsoft Informatica Ltda., São Paulo, Brazil).

Results

Thirty-two isolates of *Prototheca bovis* were obtained, based on genetic analyses, all isolates were characterized as *P. bovis* (*P. zopfii* genotype 2) being to 450 bp fragment of the internal amplification control and genotype 2-specific amplicon (165 bp) detectable for all of them.

The results obtained in our *in vitro* susceptibility testing of antibacterial drugs against the isolates of *P. bovis* showed resistance to all tested (MIC > 128 µg/mL). In the trials with plant essential oils (Table 1), we can also see that none of the extracts presented an action against algae, both in the minimum inhibitory concentration tests, as well as in the tests of minimum algicide concentration.

Table 1. *In vitro* susceptibility testing of *Prototheca bovis* against essential oils.

	MIC (µg/mL)			
	<i>Prototheca bovis</i> (32 isolates)			
	MIC		MAC	
	GM	Range	MAC	Range
Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	320,0	320 - >320	320,0	320 - >320
White thyme (<i>Thymus vulgaris</i>)	95,1	80 - >320	201,5	160 - >320
Cinnamon (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	156,2	80 - >320	204,9	160 - >320
Mint (<i>Mentha spicata</i>)	219,2	160 - >320	>320,0	>320
Oregano (<i>Origanum vulgare</i>)	160,0	160 - >320	>320,0	>320
Basil (<i>Ocimum basilicum</i>)	85,4	40 - >320	173,5	160 - >320
Garlic (<i>Allium sativum</i>)	196,9	160 - >320	>320,0	>320
Black pepper (<i>Piper nigrum</i>)	125,2	80 - >320	293,4	160 - >320
Cinnamaldehyde	106,5	40 - >320	286,4	160 - >320
Thymol	98,0	20 - >320	220,3	160 - >320
Citral	129,9	40 - >320	160,0	160 - >320
Geraniol	>320,0	>320	>320,0	>320
Eucalyptol	>320,0	>320	>320,0	>320
Carvacrol	185,6	40 - >320	>320,0	>320
Citronellol	>320,0	>320	>320,0	>320

MIC, minimum inhibitory concentration; GM, geometric mean; MAC, minimum algacidal concentration.

The most significant results observed were the minimum inhibitory concentrations of antifungal drugs (Table 2). MIC values of terbinafine were in the range of 0.5 to 128 µg/mL (geometric means: 3.1 µg/mL), the highlight being the lower geometric mean. Amphotericin B showed the better activity against all *P. bovis* isolates with the lowest MIC ranged from 0.5 to 32 µg/mL (geometric means: 4.0 µg/mL). MIC values for ketoconazole ranged from 2 to 32 µg/mL (geometric mean: 13,5 µg/mL); Itraconazole ranged from 8 to 32 µg/mL (geometric mean: 18,7 µg/mL); Clotrimazole ranged from 8 to 128 µg/mL (geometric mean: 27 µg/mL). Nystatin, Miconazole and Fluconazole was also able to inhibit the growth of *P. bovis* strains, however, with slightly higher concentrations; values of MIC ranged from 64 to 128 µg/mL, 64

to 128 µg/mL and 32 to 128 µg/mL respectively (geometric means: 69.9, 71 and 76.6 µg/mL, respectively).

Table 2. *In vitro* susceptibility tests of isolates of *Prototheca bovis* against antifungal drugs.

	MIC (µg/mL)			
	<i>Prototheca bovis</i> (32 isolates)			
	GM	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Fluconazole	76.6	32 - >128	64	>128
Miconazole	71.0	64 - >128	64	>128
Nystatin	69.9	64 - >128	64	>128
Clotrimazole	27.0	8 - >128	64	64
Itraconazole	18.7	8 - 32	16	32
Ketoconazole	13.5	2 - 32	16	32
Amphotericin B	4,0	0.5 - 32	1	32
Terbinafine	3.1	0.5 - >128	2	32

GM, geometric mean; MIC, minimum inhibitory concentration; MIC₅₀, the lowest concentration that inhibits 50% of strains; MIC₉₀, the lowest concentration that inhibits 90% of strains.

Discussion

In *in vitro* tests with essential oils, monoterpenes and terpenes, they showed very low inhibition capacity, different from that found by other researchers [13]. The inhibitory effect was observed in monoterpenes such as thymol, with a range from 20 to > 320 µg/mL, but with a high geometric mean of 98 µg/mL; as well as citral, cinnamaldehyde and carvacrol, all with a variation of 20 to > 320 µg/mL, but with high geometric average above > 100 µg/mL. Essential oils will have almost no inhibitory activity. No evaluation of the phytochemical composition of essential oils has been carried out.

In our study with antifungals we can observe that amphotericin B presents similar results to other researchers, when using the same test methodology [17] and also with other test methodologies [10, 18-25], where once again its inhibitory capacity on algae is demonstrated. The effect of azoles on algae is also like results found by other researchers, especially ketoconazole [21, 23, 24] and itraconazole [22, 23], these two azole derivatives also demonstrated their inhibitory capacity *in vitro*, but they are also used as an option for initial treatment caused by algae.

Also highlighted in the test is the inhibitory effect produced by the antifungal Terbinafine, few tested so far in *in vitro* experiments, against the algae *Prototheca bovis* [34]. Terbinafine is a synthetic allylamine, which has an inhibitory action on the enzyme squalene epoxidase and thus blocks the ergosterol biosynthesis of the fungal membrane [27]. In addition fungal toxicity occurs with the accumulation of squalene inside the cell [28]. Terbinafine has

particularities related to the mechanism of action of triazoles, where both antifungals act to inhibit enzymes involved with the synthesis of ergosterol, but terbinafine seems to have an advantage, because it acts earlier in the chain of biosynthesis, having a primary fungicidal effect, while itraconazole causes the inhibition of enzymes dependent on cytochrome P-450, obtaining a primarily fungistatic effect [29].

Additional evaluations are necessary to confirm terbinafine as an alternative against *P. bovis*. It should include susceptibility tests with other important species belonging to this genus, as well as evaluation of cytotoxicity and in vivo tests.

Conclusions

With this *in vitro* work, we confront several isolates of *Prototheca bovis* against 36 antimicrobials of different natures, we ratify the difficulty of control over the algae, and once again the capacity of amphotericin B was observed to produce an inhibitory effect on the microorganism, but what most attracted our attention was the MIC produced by terbinafine, being very similar to that produced by amphotericin B. With this experiment we emphasize the possibility of using terbinafine as a possible therapeutic agent against algae. This antifungal was absent in most of the *in vitro* sensitivity tests, published so far. However, we know that further susceptibility tests are required to observe the potential of this allylamine in the control of *Prototheca bovis*.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

References:

1. Roesler U, Scholz H, Hensel A. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53: 1195–1199.

2. Jagielski T, Lagneau PE, Protothecosis. A pseudofungal infection. *J Mycol Médic* 2007; 17: 261-270.
3. Lass-Flörl C, Mayr A. Human Protothecosis. *Cl Microb Rev*. 2007; 20: 230–242.
4. Mayorga J, Barba-Gómez JF, Verduzco-Martínez AP, *et al.* Protothecosis, *Cl Dermatol*. 2012; 30: 432–436.
5. Roesler U, Möller A, Hensel A, *et al.* Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56: 1419–1425.
6. Satoh K, Ooe K, Nagayama H, *et al.* *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010, 60: 1236–1240.
7. Masuda M, Hirose N, Ishikawa T, *et al.* *Prototheca miyajii* sp. nov., isolated from a patient with systemic protothecosis. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016; 66: 1510-1520.
8. Camboim EKA, Neves PB, Júnior FG, *et al.* Prototecose: uma doença emergente. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2010; 30: 94-101.
9. Langoni H, Troncarelli MZ, Wanderley GG, *et al.* Prototecose mamária. Um problema nos rebanhos leiteiros. *Vet. Zootec*. 2013; 20: 552-566.
10. Buzzini P, Turchetti B, Branda E, *et al.* Large-scale screening of the *in vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* towards polyene antibiotics. *Medical Mycol*. 2008; 46: 511-514.
11. Cuc (Bouari) C, Cătoi C, Fiț N, *et al.* The inhibitory effect of some natural essential oils upon *Prototheca* algae *in vitro* growth. *B Univ Agric Scie Vet. Med*. 2010; 67: 34-38.
12. Krukowski H, Lisowski A, Nowakowicz-Dębek B, *et al.* Susceptibility of *Prototheca zopfii* strains isolated from cows with mastitis to chlorhexidine and iodine. *Turkish J Vet An Scie*. 2013; 37: 106-108.
13. Grzesiak B, Głowacka A, Krukowski H, *et al.* The *in vitro* efficacy of essential oils and antifungal drugs against. *Prototheca zopfii*. *Mycopathologia* 2016; 181: 609-615.
14. Pore RS, Shahan TA, Pore MD, *et al.* Occurrence of *Prototheca zopfii*, a Mastitis Pathogen, in Milk. *Vet Microbiol*. 1987; 15: 315-323.

15. Roesler U, Möller A, Hensel A, *et al.* Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56: 1419–1425.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3 : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. - 3rd ed. CLSI: Wayne, PA, USA. 2008.
17. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, *et al.* *In vitro* activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. *J Antimicrobial Chemot.* 2008; 61: 1312–1314.
18. McDonald JS, Richard JL, Anderson AJ. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infections. *American J Vet Res.* 1984; 45: 1079-1080.
19. Malinowski E, Lassa H, Kłossowska A. Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udders. *B Univ Agric Scie Vet Med.* 2002; 46: 295-299.
20. Marques S, Silva E, Carvalheira J, Thompson G. Short communication: *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *J Dairy Scie.* 2006; 89: 4202-4204.
21. Lopes MM, Ribeiro R, Carvalho D, Freitas G. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitis in a Portugal dairy herd. *J Mycol Méd.* 2008; 18: 205-209.
22. Sobukawa H, Kano R, Ito T, *et al.* *In vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. *Med Mycol.* 2011; 49: 222–224.
23. Jagielski TM, Buzzini P, Lassa H, *et al.* Multicentre Etest evaluation of *in vitro* activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis *Prototheca* spp. isolates. *J Antimicrob Chemot.* 2012; 67: 1945-1947.
24. Wawron W, Bochniarz M, Piech T, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *B Vet Inst Pulawy.* 2013; 57: 485-488.
25. Shahid M, Ali T, Zhang L, *et al.* Characterization of *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cases of bovine mastitis and cow barns in China. *Mycopathologia* 2016; 181: 185–195.

26. Morandi S, Cremonesi P, Capra E, *et al.* Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. *J Dairy Sci.* 2016; 99: 1-10.
27. Brunton L, Parker K, Blumenthal D, *et al.* Godman & Gilman – Manual de Farmacologia e Terapêutica. Porto Alegre : AMGH Ed. Ltda., 2010.
28. Spinoza HS, Górniak SL, Bernardi MM. Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária. 5 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2014.
29. Meinerz ARM, Cleff MB, Nascente PS, *et al.* Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos *Wistar*. *Brazilian J Pharmac Scie.* 2007; 43: 105-109.
30. Jagielski T, Z. Bakula, J. Gawor, K. Maciszewski, W.-H. Kusber, M. Dyla, J. Nowakowska, R. Gromadka, A. Karnkowska. The genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. *Algal Research* 2019; 43:1-19.
31. Van Burik, J. A., R. W. Schreckhise, T. C. White, R. A. Bowden and D. Myerson. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med. Mycology.* 1998; 36:299-303.
32. Roesler, U., A. Möller, A. Hensel, D. Baumann and U. Truyen. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56:1419-1425.
33. Jagielski, T., H. Lassa, J. Ahrholdt, E. Malinowski and U. Roesler. Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Vet. Microbiol.* 2011; 149:283–287.
34. Macesic N., Fleming S., Kidd S., Madigan V., Chean R., Ritchie D., Slavin M.. Protothecosis in hematopoietic stem cell transplantation: case report and review of previous cases. *Transpl Infect Dis* 2014; 16: 490–495.
35. Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., M. Rinaldi, G., Walsh, T. J. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. *J Clin Microbiol*, 2002; 40:3204-3208.

5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II

Algaecide activity of antimicrobial peptides compounds against *Prototheca bovis*

Artigo publicado no periódico Journal of Dairy Science

Referência:

SPEROTTO, V. R.; DENARDI, L. B.; WEIBLEN, C.; JESUS, F. P. K.; DORNELES, M. R.; IANISKI, L. B.; SANTURIO, J. M. *Short communication*: Algaecide activity of antimicrobial peptides compounds against *Prototheca bovis*. **J Dairy Sci.** vol. 104, n 3, 2021.

doi: 10.3168/jds.2020-18171

***Short communication: Algaecide activity of antimicrobial peptides compounds against
Prototheca bovis***

V. R. Sperotto*,^{1,3} L. B. Denardi,^{1,2} C. Weiblen,² F. P. K. Jesus,² M. R. Dorneles,³ L. B. Ianiski,^{2,4} J. M. Santurio^{1,2}

¹Pharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

²Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

³University of Cruz Alta, Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

*Vitor da Rocha Sperotto

University of Cruz Alta, Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil

Rodovia Municipal Jacob Della Mea, s/n km 5,6 - Parada Benito, Cruz Alta - RS, 98020-290, Brazil. Tel/Fax: +55 (55) 3321-1500; E-mail: vrocha@unicruz.edu.br

ABSTRACT

This study evaluated the *in vitro* activity of antimicrobial peptides pexiganan (MSI-78), h-Lf1-11, LL-37, cecropin B, magainin-2 and fengycin B against the veterinary mastitis agent

Prototheca bovis. The results showed that pexiganan, h-Lf1-11, LL-37 and cecropin B were able to inhibit the growth and had effect on algaeicide *P. bovis* isolates (n = 32). The minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 5.0 to 10 µg/mL for pexiganan, and algaeicide effect was detected from 5.0 to 20 µg/mL. The MIC ranged from 10 to 80 µg/mL for h-Lf1-11, 20 to 80 µg/mL for LL-37 and 40 to 160 µg/mL for cecropin B. These findings present a promising and novel alternative for *P. bovis* treatment and growth control.

Keywords: protothecosis, antimicrobial peptides, h-Lf1-11, cecropin B

INTRODUCTION

In veterinary medicine, *Prototheca bovis* is the main causative agent of bovine mastitis, an achlorophyllous algae classified as a new taxonomic form of *P. zopfii* (genotype 2) (Roesler et al., 2006; Jagielski et al. 2019). Mastitis caused by *P. bovis* is becoming endemic worldwide, especially due to poor environmental conditions, insufficient milking hygiene and contagion forms between animals (Moroni et al., 2018).

As an algae is the etiological agent, no specific drugs are available and antifungals are implied. In consequence of the few alternatives available for algae control, besides amphotericin B and azole derivatives, the research on new drugs has been stimulated. The literature points out new compounds with *in vitro* action against algae such as guanidine, iodopropynyl butylcarbamate and silver nanoparticles (Alves, et al., 2017; Jagielski, et al., 2017a; Jagielski, et al., 2018). Within this context, a new group of compounds known as antimicrobial peptides (AMPs) emerges as a possible alternative, demonstrating a significant effect against multi-resistant microorganisms (Ebbensgaard et al., 2015; Kang et al., 2017; Ciandrini et al., 2018).

AMPs are a group of small innate immune molecules which have generally short amino acid sequences, positive charge, and amphiphilic properties that are recently studied due to their antimicrobial activities. They have been isolated from many animals, plants, and microorganisms, in addition to being chemically synthesized (Patel and Akhtar, 2017). The antimicrobial mechanisms of AMPs have been recognized for its action on the membrane of microorganisms altering its permeability, and act on intracellular targets (Lee et al., 2016).

In previous studies, these compounds showed action against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, and filamentous fungi (Phoenix et al., 2013; Kang et al., 2017; Spencer et al., 2018). The activity of bovine antimicrobial peptides such as Bac5 and BMAP-28 against *Prototheca* spp. has already been demonstrated (Tomasinsig et al., 2012), however, there are still very few studies that evaluated AMPS activity against this pathogenic alga.

In this way, this study aim to evaluate the antimicrobial action of six AMPs that showed some previous antimicrobial activity, namely MSI-78 (pexiganan), h-LF1-11, cecropin B, LL-37, magainin-2 and fengycin B against isolates of *P. bovis*. *In vitro* tests were performed to evaluate the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum algacide concentrations (MAC).

MATERIALS AND METHODS

Antimicrobial Peptides

Six different AMPs were acquired and evaluated for anti-*Prototheca* activity, as follows: h-LF1-11, MSI-78, LL-37, fengycin B, magainin-2 and cecropin B. The compounds were purchased in powder form from the Chinese company GL Biochem (Shanghai) Ltd. (519 Ziyue Road, Minhang Shanghai 200241, China). For susceptibility testing, these AMPs were solubilized in sterile ultrapure water and stored in at -80°C. For routine usage, working solutions were prepared in RPMI 1640 broth supplemented with dextrose and buffered with MOPS (3 N-

morpholino propane sulfonic acid) (RPMI-MOPS) (Merck, São Paulo, Brazil). The concentration range for all the AMPs ranged from 0,004 to 320 µg/mL (Wiegand et al., 2008).

Characterization of Prototheca samples

A total of ninety-four milk samples were collected from bulk tanks in farms of the Northwest region of the State of Rio Grande do Sul, Brazil, in thirty different municipalities. For organism's isolation, milk samples were precultured in *Prototheca* enrichment medium (PEM), to this was added 1 ml PEM for each 5 ml of milk caps loosened and with gentle agitation (shaker platform), at room temperature for 96 hours (Pore et al., 1987). Strains of *Prototheca* sp. were isolated from the milk samples. All strains were microscopically analyzed for the presence of sporangium with endosporulation (Roesler et al., 2006) and confirmatory identification was performed by molecular analysis. The protocol used for genomic DNA extraction was the same as designated by Jagieski et al. (2017b). DNA was extracted according to the protocol of Van Burik et al. (1998) with modifications.

Genotype specific PCR 18S rDNA assay was conducted as described previously Roesler et al., (2006) and Jagielski et al., (2011). The strains were stored in vials with saline solution (0.85%), sealed and kept at room temperature (± 25 °C). At the time of use, the strains were reactivated on YPD agar and incubated for 72 h at 28 °C.

Susceptibility Tests

AMPs' activity against *P. bovis* strains was determined using the reference method of broth antifungal susceptibility testing for yeasts, with few modifications (CLSI document M27-A3, 2008). This test was chosen considering the absence of universally accepted procedures or specific interpretative criteria for *Prototheca* species, as well as similarity in growth conditions of *P. bovis* and yeasts. For inoculum preparation, strains were subcultured on YPD agar medium

at 28°C for 72h and two to five colonies were collected and resuspended in sterile saline solution (0.85%). Cell density was adjusted in a spectrophotometer, to obtain the equivalent absorbance of McFarland scale for 0.5 at 530 nm. The working suspension was prepared by diluting 1:50 in saline, followed by a 1:20 dilution in RPMI-MOPS liquid medium, resulting in a concentration of $1-5 \times 10^3$ cells/mL (M27-A3, CLSI, 2008)

Plates for inhibition tests contained 100 μ L of each dilution of previously prepared AMPs (distributed twice) and their final concentrations; 100 μ L were added from the previously standardized inoculum. Sterility (negative) and growth (positive) controls were present in every experiment. MICs were determined after 48 hours of incubation at 35 °C. The results were obtained from visually readings based on 100% of inhibition/absence of growth compared to their positive control (M27-A3, CLSI, 2008)

The strains were also evaluated against amphotericin B (Merck, São Paulo, Brazil) as a reference for sensitivity, as described above. The antifungal compound was diluted in DMSO (Merck, São Paulo, Brazil) and then in RPMI – MOPS for working solution. The concentrations tested ranged from 0.125 to 64 μ g/mL. The standard strains of *Candida albicans* ATCC 90028 were included as an internal control (M27-A3, CLSI, 2008).

The minimal algacide concentration (MAC) was determined as follows: 20 μ l aliquots collected from each well that presented complete growth inhibition and harvested onto SDA plates. Plates were incubated at 28°C until growth was detected in the control subculture (48-72h). MAC was considered as the lowest drug concentration that resulted in absence of growth (Espinel-Ingroff et al., 2002). All experiments were carried out in triplicate.

Statistical Analyses

Both, MIC and MAC results obtained from the thirty-two *P. bovis* strains were included in the analyses. MIC₅₀ (MIC value at which $\geq 50\%$ of the strains were inhibited) and MIC₉₀ (MIC value at which $\geq 90\%$ of the strains were inhibited) were determined using the Microsoft Excel 2020 (Microsoft Informatica Ltda., São Paulo, Brazil). To evaluate the difference among the MICs/MACs obtained from all AMPs survival analysis were performed by Wilcoxon test in Kaplan-Meier curves using Origin (Pro) Version Number 2020b (OrigenLab Corporation, Northampton, MA, USA). When p value was less than 0.05, it was considered that there was a significant difference in effects (inhibition or cell death) in relation to dosage (MIC/MAC).

RESULTS

Based on genetic analyses, all isolates were characterized as *Prototheca bovis* (*P. zopfii* genotype 2) being to 450 bp fragment of the internal amplification control and genotype 2-specific amplicon (165 bp) detectable for all of them.

The AMPs pexiganan, h-Lf1-11, LL-37 and cecropin B showed to have action both in inhibiting growth and kill *P. bovis* isolates, whereas magainin-2 and fengycin B did not show activity in the largest tested concentration (320 μ g/mL) (Table 1). Pexiganan showed the lowest MICs; at concentration of 10 μ g/mL it was able to kill 90% of *P. bovis* isolates, wherein more than 50% of the strains were killed with the concentration of 5 μ g/mL. Pexiganan was the only AMP that showed no significant difference ($p < 0,166$) in effects in relation to concentration, proving to be far more active than the other AMPs (Table 1, Figure 1). The second most active AMP was LL-37 that inhibited 90% of the *P. bovis* isolates with MIC $\geq 40\mu$ g/mL (MAC₉₀ $\geq 40\mu$ g/mL). MIC₉₀ and MAC₉₀ values for h-Lf1-11 was $\geq 80\mu$ g/mL. Cecropin B was also able to inhibit the growth of *P. bovis* strains, however, a higher concentration of this compound was required; values of MIC $\geq 160\mu$ g/mL (MAC $\geq 160\mu$ g/mL) to inhibit 90% of the isolates *P. bovis* (Table 1).

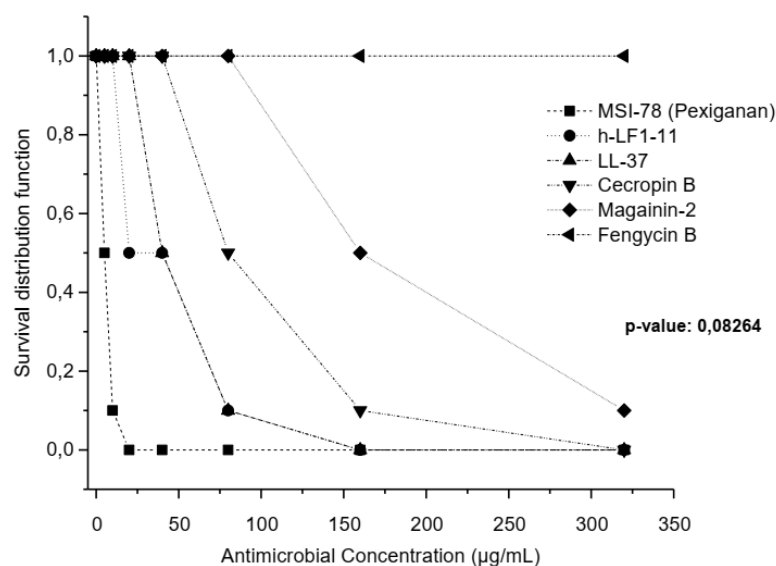
Table 1 - Percentage of isolates inhibited for each tested concentration and MIC₅₀ and MIC₉₀ values for antimicrobial peptides (AMP) against *Prototheca bovis*.

AMPs	MIC (MAC) (µg/mL)							P-value		
	5	10	20	40	80	160	>320	MIC(MAC) ₅₀	MIC(MAC) ₉₀	Wilcoxon
Pexiganan	65 (53)	35 (40)	0 (7)	0	0	0	0	5 (5)	10 (10)	<0,166570
LL-37	0	0	25 (22)	72 (69)	3 (9)	0	0	40 (40)	40 (40)	<0,011660
h-Lf1-11	0	40 (25)	19 (33)	22 (17)	19 (25)	0	0	20 (20)	80 (80)	<0,014430
Cecropin B	0	0	0	3	22	75	0	160 (160)	160 (160)	<0,011660
Magainin-2	0	0	0	0	0	0	100	>320	>320	<0,000244
Fengycin B	0	0	0	0	0	0	100	>320	>320	<0,000001

In vitro assays considering isolates (n = 32) of *Prototheca bovis*. MIC, minimum inhibitory concentration; MIC₅₀, the lowest concentration that inhibits 50% of strains; MIC₉₀, the lowest concentration that inhibits 90% of strains.

For the AMPs LL-37, h-Lf1-11 and cecropin B, there was a significant difference in effect (death or growth inhibition) in relation to concentration (MIC and MAC) (Figure 1). Although the evaluation of the survival curve shows significant data in relation to the MICs and MACs of fengycin B and magainin-2, for the purposes of interpretation, these two AMPs were considered non-active against *P. bovis*, since 100% of the isolates were not inhibited at the highest concentration evaluated. The standard antifungal drug used, amphotericin B, presented MIC $\geq 16\mu\text{g/mL}$ to inhibit 90% of the isolates *P. bovis* (data not shown).

Figure 1. Kaplan-Meier survival curves of the different AMPs confronted against *Prototheca bovis* isolates.



DISCUSSION

This study reports inhibitory and algacide activity of AMPs against *P. bovis*, which appears to be the first to confront AMPs and this microorganism to date. Pexiganan showed an excellent action, represented by the smallest MIC values even comparing to amphotericin B. Pexiganan or MSI-78 (GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK-NH₂) is a 22 amino acid peptide, α -helical and structurally analog to the natural occurring magainin-2 (isolated from frog skin of *Xenopus laevis*) (Neshani et al., 2018). Pexiganan is already approved by the FDA (Food and Drug Administration) for the treatment of mild diabetic foot infections and may also be an alternative for treating acute bacterial skin infections, such as infected decubitus ulcers, surgical wounds, burns and nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Kang et al., 2017). It has been reported that pexiganan disrupts bacterial membranes by forming toroidal pores in an amphipathic α -helical arrangement, thus allowing the insertion of a well-defined hydrophobic sector into the lipid bilayer, leading to hydroelectrolytic imbalance of the microbial cell (Monteiro et al., 2015). Although the mechanism of action against *P. bovis* was not elucidated here, positively charged AMPs such as pexiganan may interact electrostatically with the negative charged algae membrane, then inserting positively charged residues into the interfacial region.

A pronounced algacide action was also demonstrated by the human lactoferrin derivate, the h-Lf1-11 (GRRRRSVQWCA), a cationic AMP known for its bactericidal effects against MRSA (Stallman et al., 2003) and antifungal effect against *Candida albicans* biofilms (Morici et al., 2016). AMPs (BMAP-28, Bac 5 and LAP) derived from bovine lactoferrin have already been evaluated against *Prototheca* species and corroborate with our findings; MIC ranged from 0.5 to 16 µg/mL. In the same study, authors demonstrate that the release of ATP from the microbial cell was induced by AMPs, indicating rapid membrane lysis (Tomasinsig et al., 2012), and other authors have shown that h-Lf1-11 can penetrate the membrane and cell wall without destroying their integrity. Also, h-Lf1-11 can bind to the DNA molecule, so we speculate that DNA may also be a target of this AMP, leading to microbial cell death (Huo et al., 2011). To date, there are no new published experiments on the use of AMPs against the *Prototheca* genus, except for the above-mentioned study by Tomasinsig et al., conducted in 2012.

The LL-37 MIC was higher than those of amphotericin B, but presented an important inhibitory and inactive effect against *P. bovis* isolates. LL-37 acts against Gram-positive and negative bacteria, as well as multi-resistant bacteria such as *Acinetobacter baumannii* and MRSA, although it requires high concentrations of this molecule for inhibition (Ciandrini et al., 2018; Spencer et al., 2018). Its action against *Candida* species is worth mentioning, as LL-37 was able to prevent *C. albicans* adhesion in host cells, through translocation across the membrane and accumulation within the yeast cell (Tsai et al., 2011). In addition to its direct antimicrobial effect, LL-37 plays a significant role in the first line of defense against superficial and systemic pathogens, controlling inflammation and endotoxin processes (Yang et al., 2000).

Cecropins are cationic AMPs originally found in insects. Growth inhibition was detected for Gram-negative bacteria, such as *E. coli* and *P. aeruginosa*, but not in Gram-positive bacteria such as *S. aureus* (Ebbensgaard et al., 2015; Wang et al., 2018). Although this AMP

inhibited *P. bovis* growth, high concentrations were required. In this way, cecropin B may not be the best choice for further studies on *P. bovis* susceptibility, as other AMPs evaluated here demonstrated a greater inhibiting action against this microorganism in lower concentrations. Conversely, fengycin B and magainin-2 AMPs demonstrate a lack of activity against *P. bovis* isolates.

Although it was observed in this study that LL-37 and h-Lf1-11 AMPs were able to inhibit strains of *P. bovis* in different concentrations, there are no defined breakpoints for AMPs and still little is known about the concentration reached in blood and other biological fluids, such as milk. It is of essential importance to highlight that this *in vitro* study cannot predict whether the AMPs evaluated will be clinically viable. However, many parallel studies seek for ways to make AMPs physiologically stable, so they can be considered for clinical use (Lei et al., 2019). Even so, defining which molecules demonstrate a greater potential for further studies is a key step.

In this study, it was not possible to assess the cytotoxicity of AMPs to *P. bovis* and future research should be performed to enlighten this question. Previous papers have demonstrated that AMPs do not cause cellular damage in concentrations that inhibit the growth or destroy microorganisms (Gotller et al., 2009), which can be considered as a promising alternative.

Further evaluations are needed to elucidate the exact mechanism of action of these compounds against *Prototheca*. This includes susceptibility testing with other species of importance belonging to this genus, and cytotoxicity and *in vivo* assays. Finally, it is of utmost importance to evaluate the stability and concentration in biological fluids, which ensures the possible use of antimicrobial peptides in the treatment of infections caused by *Prototheca*.

CONCLUSIONS

This *in vitro* study demonstrated the potential of AMPs against *P. bovis*, bringing new perspectives to the application of antimicrobial peptides against these multi-resistant microorganisms. We highlight the anti-*Prototheca* action produced by the compound pexiganan as a promising alternative for the control of this mastitis-causing agent. New tests are still required to assess its inhibitory potential, along with the evaluation of pharmacological and cytotoxic characteristics of the compound for *in vivo* testing.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; process 406170/2018-5). Denardi LB, thanks for the Post-Doctoral fellow of the CNPq (PDJ -150752//2018-0).

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

REFERENCES

- Alves A. C. , E. Capra, S. Morandi, P. Cremonesi, J. C. F. Pantoja, H. Langoni, A. P. C. de Vargas, M. M. da Costa, T. Jagielski, C. A. D. Bolaños, S. T. Guerra, M. G. Ribeiro. 2017. *In vitro* algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastites. Lett Appl Microbiol. 64(6):419-423.
- Ciandrini, E., G. Morrioni, D. Arzeni, W. Kamysz, D. Neubauer, E. Kamysz, O. Cirioni, L. Brescini, W. Baffone and R. Campana. 2018. Antimicrobial activity of different antimicrobial peptides (AMPs) against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Cur Top Med Chem. 18:1-9.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. M27-A3: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. - 3rd ed. CLSI: Wayne, PA, USA.

Espinel-Ingroff, A., A. Fothergill, J. Peter, M. G. Rinaldi, T. J. Walsh. 2002. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. *J Clin Microbiol* 40:3204-3208.

Ebbensgaard, A., H. Mordhorst, M. T. Overgaard, C. G. Nielsen, F. M. Aarestrup and E. B. Hansen. 2015. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. *PLOS One*. 11:1-18.

Gottler, L. M. and Ramamoorthy, A. 2009. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan--a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim Biophys Acta*.1788:1680-1686.

Huo, L., K. Zhang, J. Ling, Z. Peng, X. Huang, H. Liu and L. Gu. 2011. Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments of human lactoferrin and histatin 5 against *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol*. 56:869-876.

Jagielski, T., H. Lassa, J. Ahrholdt, E. Malinowski and U. Roesler. 2011. Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Vet. Microbiol*. 149:283–287.

Jagielski, T., Z. Bakula, S. Di Mauro, C. Casciari, V. Cambiotti, H. Krukowski, B. Turchetti, M. Ricchi, E. Manuali and P. A. Buzzini. 2017a. A comparative study of the *in vitro* activity of iodopropynyl butylcarbamate and amphotericin B against *Prototheca* spp. isolates from European dairy herds. *J. Dairy Sci*. 100:1–11.

Jagielski, T., J. Gawor, Z. Bakula, K. Zuchniewicz, I. Żak and R. Gromadka. 2017b. An optimized method for high quality DNA extraction from microalga *Prototheca wickerhamii* for genome sequencing. *Plant Methods*. 13:77.

Jagielski T., Z. Bakula, M. Pleń, M. Kamiński, J. Nowakowska, J. Bielecki, K. Wolska and A. M. Grudniak. 2018. The activity of silver nanoparticles against microalgae of the *Prototheca* genus. *Nanomedicine*. 13(9):1025-1036.

Jagielski T, Z. Bakula, J. Gawor, K. Maciszewski, W.-H. Kusber, M. Dyląg, J. Nowakowska, R. Gromadka, A. Karnkowska. 2019. The genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. *Algal Research* 43:1-19b.

Kang, H.-K., C. Kim, C. H. Seo and Y. Park. 2017. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J. Microbiol.* 55:1-12.

Lee, T.-H., K. N. Hall and M.-I. Aguilar. 2016. Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Cur. Top. Med. Chemist.* 16:25-39.

Lei, J., L. Sun, S. Huang, C. Zhu, P. Li, J. He, V. Mackey, D. H. Coy and Q. He. 2019. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am Transl Res.* 11: 3919–3931.

Moroni, P., D. V. Nydam and P. A. Ospina. 2018. Diseases of the teats and udder. In: *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle. (Third Edition)*, 389-465.

Patel, S. and N. Akhtar. 2017. Review Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential ‘offense and defense’ molecules are more than antimicrobials. *Biomed Pharmacoth.* 95:1276–1283.

Phoenix, D. A., S. R. Dennison and F. Harris. 2013. Antimicrobial peptides: their history, evolution, and functional promiscuity. *Antimicrob. Peptid.* 1–37.

Pore, R. S., T. A. Shahan, M. D. Pore and R. Blauwiekel. 1987. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen, in milk. *Vet. Microbiol.* 15:315-323.

Roesler, U., A. Möller, A. Hensel, D. Baumann and U. Truyen. 2006. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and

description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Internat. J. Systemat. Evolut. Microbiol.* 56:1419-1425.

Spencer, J. J., R. E. Pitts, R. A. Pearson and L. B. King. 2018. The effects of antimicrobial peptides wam-1 and LL-37 on multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Pathog. Dis.* 76:1-6.

Stallmann, H. P., C. Faber, E. T. Slotema, D. M. Lyaruu, A. L. J. J. Bronckers, A. V. N. Amerongen and P. I. J. M. Wuisman. 2003. Continuous-release or burst-release of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11) from calcium phosphate bone substitutes. *J. Antimicrob. Chemoth.* 52:853–855.

Tomasinsig, L., B. Skerlavaj, M. Scarsini, F. Guida, R. Piccinini, A. Tossib and M. Zanettia. 2012. Comparative activity and mechanism of action of three types of bovine antimicrobial peptides against pathogenic *Prototheca* spp. *J. Peptide Sci.* 18:105-113.

Tsai, P. W., C. Y. Yang, H. T. Chang and C. Y. Lan. 2011. Human antimicrobial peptide ll-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cellwall carbohydrates. *PLoS ONE.* 6:e17755.

Van Burik, J. A., R. W. Schreckhise, T. C. White, R. A. Bowden and D. Myerson. 1998. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med. Mycology.* 36:299-303.

Yang, D., Q. Chen, A. P. Schmidt, G. M. Anderson, J. M. Wang, J. Wooters, J. J. Oppenheim and O. Chertov. 2000. LL-37, the neutrophil granule–and epithelial cell–derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor–like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* 192:1069–74.

Wang, J., K. Ma, M. Ruan, Y. Wang, Y. Li, Y. V. Fu, Y. Song, H. Sun and J. Wang. 2018. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. *PeerJ*. 6:e5369.

Wiegand, I., K. Hilpert, R. E. W. Hancock. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 3:163–175.

6. DISCUSSÃO

Em nosso estudo *in vitro*, com antibacterianos contra os isolados da alga *P. zopfii* (genótipo 2), não foram observadas atividades inibitórias (>128 µg/mL), diferente do encontrado por outros pesquisadores (MALINOWSKI et al., 2002; LOPES et al, 2008), que conseguiram observar atividade de antibacterianos contra a alga. Podemos afirmar através dos testes, que os antibacterianos, os principais fármacos utilizados para terapias contra mastites bovinas, não possuem atividade contra estes isolados da alga, presentes em uma das mais importantes regiões produtoras de leite do Brasil.

Nos testes *in vitro* com óleos essenciais, monoterpenos e terpenos, estes mostraram capacidade de inibição muito baixa, diferente do encontrado por outros pesquisadores (GRZESIAK et al., 2018). O efeito inibitório foi observado nos monoterpenos como o timol, com variação de 20 a >320 µg/mL, mas com média geométrica alta de 98 µg/mL; assim como o citral, o cinamaldeído e o carvacrol, todos com variação de 20 a >320 µg/mL, mas com média geométrica alta acima das >100 µg/mL. Os óleos essenciais não apresentaram quase nenhuma atividade inibitória. Não foram realizadas avaliações de composição fitoquímica dos óleos essenciais.

No estudo com antifúngicos podemos observar que a anfotericina B apresenta resultados semelhantes aos de outros pesquisadores, ao utilizar a mesma metodologia de teste (TORTORANO et al., 2008) e também com outras metodologias de teste (BUZZINI et., 2008; MCDONALD et al., 1984; MALINOWSKI et al., 2002; MARQUES et al., 2006; LOPES et al, 2008; SOBUKAWA et al., 2011; JAGIELSKI et al., 2012; WAWRON et al., 2013; SHAHID et al., 2016). O efeito dos azóis nas algas também é semelhante aos resultados encontrados por outros pesquisadores, especialmente o cetoconazol (LOPES et al, 2008; JAGIELSKI et al., 2012; WAWRON et al., 2013) e o itraconazol (SOBUKAWA et al., 2011; JAGIELSKI et al., 2012). Os nossos resultados com antifúngicos, mostraram semelhança com outros estudos.

Destaca-se também no teste o efeito inibitório produzido pelo antifúngico terbinafina, pouco testado em experimentos *in vitro*, contra a alga *P. zopfii* (genótipo 2) (MACESIC et al., 2014). A terbinafina é uma alilamina sintética, que tem ação inibitória sobre a enzima esqualeno epoxidase e, portanto, bloqueia a biossíntese de ergosterol da membrana fúngica (BRUNTON

et al., 2010). Além disso, a toxicidade fúngica ocorre com o acúmulo de esqualeno dentro da célula (SPINOSA et al., 2014). A terbinafina apresenta particularidades relacionadas ao mecanismo de ação dos triazóis, onde ambos os antifúngicos atuam inibindo enzimas envolvidas com a síntese do ergosterol, mas a terbinafina parece ter uma vantagem, pois atua precocemente na cadeia de biossíntese, tendo um efeito fungicida primário, enquanto o itraconazol causa a inibição de enzimas dependentes do citocromo P-450, obtendo um efeito principalmente fungistático (MEINERZ et al., 2007).

No estudo dos PAMs, estes apresentaram atividade inibitória e algicida contra *P. zopfii* (genótipo 2), que parece ser o primeiro a confrontar PAMs e este microrganismo até o momento. O pexiganan mostrou uma ação excelente, representada pelos menores valores de CIM mesmo em comparação aos antifúngicos testados como a anfotericina B e a terbinafina. O pexiganan ou MSI-78 (GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK-NH₂) é um peptídeo de 22 aminoácidos, α -helicoidal e estruturalmente análogo à magainina-2 de ocorrência natural (isolada de pele de rã de *Xenopus laevis*) (NESHANI et al., 2018). O pexiganan foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de infecções leves do pé diabético e também pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções cutâneas bacterianas agudas, como úlceras de decúbito infectadas, feridas cirúrgicas, queimaduras e colonização nasal e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) (KANG et al., 2017).

Foi relatado que o pexiganan rompe as membranas bacterianas formando poros toroidais em um arranjo α -helicoidal anfipático, permitindo assim a inserção de um setor hidrofóbico bem definido na bicamada lipídica, levando ao desequilíbrio hidroeletrolítico da célula microbiana (MONTEIRO et al., 2015). Embora o mecanismo de ação contra isolados de *P. zopfii* (genótipo 2) não tenha sido elucidado aqui, PAMs carregados positivamente, como o pexiganan, podem interagir eletrostaticamente com a membrana de algas carregada negativamente, inserindo então resíduos carregados positivamente na região interfacial.

Uma ação algicida pronunciada também foi demonstrada pelo derivado da lactoferrina humana, o h-Lf1-11 (GRRRRSVQWCA), um PAM catiônico conhecido por seus efeitos bactericidas contra MRSA (STALLMAN et al., 2003) e efeito antifúngico contra biofilmes de *Candida albicans* (MORICI et al., 2016). No estudo de Tomasinsig et al., (2012), o primeiro com PAMs (BMAP-28, Bac 5 e LAP) derivados da lactoferrina bovina, contra *Prototheca* spp. corroboram com nossos achados; o CIM variou de 0,5 a 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$. No mesmo estudo, os

autores demonstraram que a liberação de ATP da célula microbiana foi induzida por PAMs, indicando rápida lise da membrana.

Outros autores demonstraram que h-Lf1-11 pode penetrar na membrana e parede celular sem destruir sua integridade. Além disso, o h-Lf1-11 pode se ligar à molécula de DNA, então especulamos que o DNA também pode ser um alvo desse PAM, levando à morte celular microbiana (HUO et al., 2011). Até o momento, não há novos experimentos publicados sobre o uso de PAMs contra o gênero *Prototheca*, exceto para o estudo de Tomasinsig et al. (2012).

O CIM do PAM LL-37 foi maior do que o da anfotericina B, mas apresentou um importante efeito inibitório e inativo contra isolados de *P. zopfii* (genótipo 2). O LL-37 atua contra bactérias Gram-positivas e negativas, bem como bactérias multirresistentes, como *Acinetobacter baumannii* e MRSA, embora requeira altas concentrações desta molécula para inibição (CIANDRINI et al., 2018; SPENCER et al., 2018). Vale ressaltar a ação contra espécies de *Candida*, pois o LL-37 foi capaz de prevenir a adesão de *C. albicans* nas células hospedeiras, por meio da translocação através da membrana e do acúmulo na célula de levedura (TSAI et al., 2011). Além de seu efeito antimicrobiano direto, o LL-37 desempenha um papel significativo na primeira linha de defesa contra patógenos superficiais e sistêmicos, controlando a inflamação e os processos de endotoxina (YANG et al., 2000).

O cecropin B é outro PAM catiônico originalmente encontrado em insetos, já demonstrou capacidade de inibição de crescimento contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas não em bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* (EBBENSGAARD et al., 2015; WANG et al., 2018). Embora este PAM tenha inibido o crescimento de *P. bovis*, altas concentrações foram necessárias. Desse modo, a cecropin B pode não ser a melhor escolha para novos estudos de suscetibilidade ao *P. bovis*, visto que outros PAMs aqui avaliados demonstraram maior ação inibidora contra esse microrganismo em menores concentrações. Por outro lado, fengycin B e magainin-2 foram os PAMs que não apresentaram atividade contra isolados de *P. bovis*.

Embora tenha sido observado neste estudo que os PAMs Pexiganan, LL-37 e h-Lf1-11 foram capazes de inibir cepas de *P. bovis* em diferentes concentrações, não há como afirmar que estas concentrações quando atingidas no sangue e em outros fluidos biológicos, como o leite, poderão estas serem efetivas em tratamentos contra a alga. Sendo importante destacar que este estudo *in vitro* não pode prever, se os PAMs avaliados serão clinicamente viáveis. No entanto, muitos estudos paralelos buscam maneiras de tornar os PAMs fisiologicamente

estáveis, para que possam ser considerados para uso clínico (LEI et al., 2019). Mesmo assim, definir quais moléculas apresentam maior potencial para novos estudos é uma etapa fundamental.

Neste estudo, não foi possível avaliar a citotoxicidade dos PAMs quando confrontados contra *P. bovis*, sendo esta avaliação de interesse para pesquisas futuras. Trabalhos anteriores já demonstraram que os PAMs não causam dano celular em concentrações, que inibem o crescimento ou destroem microrganismos (GOTTLER & RAMAMOORTHY, 2009), o que pode ser considerado uma alternativa promissora.

Avaliações adicionais são necessárias para elucidar o exato mecanismo de ação desses compostos contra *P. zopfii* (genótipo 2). Devendo incluir testes de suscetibilidade com outras espécies importantes pertencentes a este gênero, assim como avaliação de citotoxicidade e ensaios *in vivo*. Por fim, é de extrema importância avaliar a estabilidade e a concentração nos fluidos biológicos, o que garante a possível utilização de PAM no tratamento de infecções causadas pela alga *Prototheca* spp.

7. CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos confirmar a presença de *P. zopfii* (genótipo 2), na bacia leiteira da Região Noroeste do estado do Rio Grande do Sul, com 32 isolados da alga e ratificar a sua alta capacidade de resistência a antimicrobianos, onde podemos afirmar após os testes *in vitro* o seguinte:

- Os antibacterianos testados não apresentaram nenhuma capacidade inibitória contra os isolados da alga.

- Óleos essenciais, terpenos e monoterpenos não demonstraram capacidade inibitória, ou quando apresentaram, esta capacidade foi muito reduzida contra os isolados.

- Entre os fármacos antifúngicos foi observada a capacidade da anfotericina B de produzir um efeito inibitório sobre o microrganismo, assim como a terbinafina, com resultados semelhantes, também observamos que os derivados azólicos cetoconazol e itraconazol apresentam boa atividade inibitória contra os isolados da alga.

- Os PAMs pexiganan, LL-37 e h-Lf1-11 produziram ótimo efeito inibitório contra os isolados, surgindo como alternativa promissora, mas que precisam de mais testes para confirmação de sua capacidade inibitória contra a alga.

REFERÊNCIAS

- ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.B.; LANE, C.E.; LUKEŠ, J.; BASS, D.; BOWSER, S.S.; et al. The Revised Classification of Eukaryotes. **J Eukaryot Microb**; 59:429–93, 2012.
- AHRHOLDT, J.; MURUGAIYAN, J.; STRAUBINGER, R.; JAGIELSKI, T.; ROESLER, U. Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass Spectrometry proteomic phenotyping. **Med Mycol**, v. 50, p.234–243, 2012.
- ALVES, A.C.; CAPRA, E.; MORANDI, S.; CREMONESI, P.; PANTOJA, J.C.F.; LANGONI, H.; VARGAS, A.P.C.; COSTA, M.M.; JAGIELSKI, T.; BOLAÑOS, C.A.D.; GUERRA, S.T.; RIBEIRO, M.G. *In vitro* algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. **Let Applied Microb**. Jun;64(6):419-423, 2017.
- BERGEN, M. V.; EIDNER, A.; SCHMIDT, F.; MURUGAIYAN, J.; WIRTH, H.; BINDER, H.; MAIER, T.; ROESLER, U. Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS, **Prot Clin Applic**. v. 3, p. 774–784, 2009.
- BOUARI, C.; BOLFA, P.; BORZA, G.; NADA, G.; CATOI, C.; FIT, N. Antimicrobial activity of *Mentha piperita* and *Saturenja hortensis* in a murine model of cutaneous protothecosis. **J Mycol Méd**, v. 24, p.34-43, 2014.
- BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. **Godman & Gilman – Manual de Farmacologia e Terapêutica**. Porto Alegre : AMGH Ed. Ltda. 1219p., 2010.
- BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; BRANDA, E.; GORETTI, M.; AMICI, M.; LAGNEAU, P. E.; SCACCABAROZZI, L.; BRONZO, V.; MORONI, P.; Large-scale screening of the *in vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* towards polyene antibiotics. **Med Mycol**. August, 46, 511-514, 2008.
- CAMBOIM, E. K. A.; NEVES, P. B.; JÚNIOR; F. G.; MEDEIROS, J. M.; RIET-CORREA, E. F. Prototecose: uma doença emergente. **Pesq Vet Brasileira**, v.30, p. 94-101, 2010.
- CHANDLER, R. L. Experimental bacterial mastitis in the mouse. **J Med Microb**. Vol. 3, 273-282, 1970.
- CHANG, R.; YANG, Q.; LIU, G.; LIU, Y.; ZHENG, B.; SU J.; HAN, B. Treatment with Gentamicin on a Murine Model of Protothecal Mastitis, **Mycopathologia** 175:241–248, 2013.
- CIANDRINI, E., G. MORRONI, D. ARZENI, W. KAMYSZ, D. NEUBAUER, E. KAMYSZ, O. CIRIONI, L. BRESCINI, W. BAFFONE AND R. CAMPANA. Antimicrobial activity of different antimicrobial peptides (AMPs) against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Cur Top Med Chem**. 18:1-9, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved standard**. 2nd ed. Document M27-A2, Wayne, PA, USA, 2002.

COSTA, F., MAIA, S., GOMES J. *et al.* Characterization of hLF1–11 immobilization onto chitosan ultrathin films, and its effects on antimicrobial activity. **A Biomater**; 10:3513-21, 2014.

CUC, C. (BOUARI); CĂTOI, C.; FIȚ, N.; RĂPUNTEAN, S.; NADĂȘ G.; BOLFĂ, P.; TAULESCU, M.; GAL, A.; TĂBĂRAN, F.; NAGY, A.; BORZA, G.; MOUSSA, R. The Inhibitory Effect of Some Natural Essential Oils upon *Prototheca* Algae *in vitro* Growth. **B Univ Agric Scie Vet Med**, v. 67, 2010.

DAVIES, R.R.; SPENCER, H.; WAKELIN, P.O. A case of human protothecosis. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**. Vol. 58. No. 5. September, 1964.

EBBENSGAARD, A., H. MORDHORST, M. T. OVERGAARD, C. G. NIELSEN, F. M. AARESTRUP AND E. B. HANSEN. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. **PLOS One**. 11:1-18, 2015.

ESPINEL-INGROFF, A., FOTHERGILL, A., PETER, J., M. RINALDI, G., WALSH, T. J. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. **J Clin Microbiol**, 40:3204-3208. 2002.

FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations. **Milk and dairy products in human nutrition**. Rome, 2013.

FLAMM, R. K., RHOMBERG, P.R., FARRELL, D. J., *et al.*, *In vitro* spectrum of pexiganan activity; bactericidal action and resistance selection tested against pathogens with elevated MIC values to topical agentes. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 86, 66-9, 2016.

GONÇALVES, J. L.; LEE, S. H.; ARRUDA, E. P.; GALLES, D. P.; CAETANO, V. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. **J Dairy Scie**. Vol. 98, N. 6, 2015.

GOTTLER, L. M. AND RAMAMOORTHY, A. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan--a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. **Biochim Biophys Acta**.1788:1680-1686, 2009.

GRZESIAK, B.; GŁOWACKA, A.; KRUKOWSKI, H.; LISOWSKI, A.; LASSA, H.; SIENKIEWICZ, M. The *in vitro* efficacy of essential oils and antifungal drugs against *Prototheca zopfii*. **Mycopathologia**, 2016.

GRZESIAK, B.; KOŁODZIEJ, B.; GŁOWACKA, A.; KRUKOWSKI, H. The Effect of some natural essential oils against bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* isolates *in vitro*. **Mycopathologia**, 2018.

HUO, L., K. ZHANG, J. LING, Z. PENG, X. HUANG, H. LIU AND L. GU. Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments of human lactoferrin and histatin 5 against *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.** 56:869-876, 2011.

IMURA, Y., CHODA, N., MATSUZAKI, K. Magainin 2 in action: distinct modes of membrane permeabilization in living bacterial and mammalian cells. **Biophys J.** 95: 5757–5765, 2008.

IRRGANG, A. **Proteinbiochemische Charakterisierung von Antigenen pathogener Prototheken-Spezies.** Institut für Tier- und Umwelthygiene des Fachbereichs für Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin PhD of Biomedical Sciences, 2016.

JAGIELSKI, T; LAGNEAU, P.E. Protothecosis. A pseudofungal infection. **J Mycol Méd,** 17, 261-270, 2007.

JAGIELSKI, T. M.; BUZZINI, P.; LASSA, H.; MALINOWSKI, E.; BRANDA, E.; TURCHETTI, B.; POLLEICHTNER, A.; ROESLER, U.; LAGNEAU, P-E.; MARQUES, S.; SILVA, E.; THOMPSON, G.; STACHOWIAK, R.; BIELECKI, J. Multicentre Etest evaluation of *in vitro* activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis *Prototheca* spp. isolates. **J Ant Chemot,** 67: 1945-1947, 2012.

JAGIELSKI, T.; DYLAZG, M.; ROESLER, U.; MURUGAIYAN, J. Isolation of infectious microalga *Prototheca wickerhamii* from a carp (*Cyprinus carpio*) – a first confirmed case report of protothecosis in a fish. **J Fish Dis,** 2017.

JAGIELSKI T, Z. BAKUŁA, J. GAWOR, K. MACISZEWSKI, W.-H. KUSBER, M. DYLAĞ, J. NOWAKOWSKA, R. GROMADKA, A. KARNKOWSKA. The genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. **Alg Res** 43:1-19b, 2019.

JOY, B.; RAJAN, A.; ABRAHAM, E. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oil from *Hedychium coronarium*. **Phytoth Res,** v. 21, p. 439–443, 2007.

KANG, H.-K., C. KIM, C. H. SEO AND Y. PARK. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **J. Microbiol.** 55:1-12. 2017.

KRUKOWSKI, H.; LISOWSKI, A.; NOWAKOWICZ-DEBEK, B.; WLAZŁO, Ł. Susceptibility of *Prototheca zopfii* strains isolated from cows with mastitis to chlorhexidine and iodine. **Turkish J Vet An Scie.** 37: 106-108, 2013.

LANGONI, H.; TRONCARELLI, M.Z.; WANDERLEY, G.G.; SALINA A. Prototecose mamária. Um problema nos rebanhos leiteiros. **Vet e Zoot.** 20(4): 552-566, dez., 2013.

LASS-FLÖRL, C.; MAYR, A. Human Protothecosis. **CI Microb Review,** p. 230–242, Apr. 2007.

LEI, J., L. SUN, S. HUANG, C. ZHU, P. LI, J. HE, V. MACKKEY, D. H. COY AND Q. HE. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **Am Transl Res.** 11: 3919–3931, 2019.

LI, Y.T.; ZENG, Y.F.; NING, G.; GAN, W. Q.; LIN, C.S. A Case Report of *Prototheca* Meningitis in China. **Pharmacoeconomics**, 1:2, 2016.

LOPES, M.M.; RIBEIRO, R.; CARVALHO, D.; FREITAS, G. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitis in a Portugal dairy herd. **J Mycol Méd.** 18, 205—209, 2008.

MACESIC, N., S. FLEMING, S. KIDD, V. MADIGAN, R. CHEAN, D. RITCHIE, SLAVIN M. Protothecosis in hematopoietic stem cell transplantation: case report and review of previous cases. **Transpl Infect Dis**; 16: 490–495. 2014.

MALINOWSKI, E.; LASSA, H.; KŁOSSOWSKA, A. Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udders. **B Un Agric Scie Vet Med.** 46, 295-299, 2002.

MARQUES, S.; SILVA, E.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON, G. Short communication: *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. **J Dairy Scie.** Nov; 89 (11) : 4202-4, 2006.

MASUDA, M.; HIROSE, N.; ISHIKAWA, T.; IKAWA, Y.; NISHIMURA, K. *Prototheca miyajii* sp. nov., isolated from a patient with systemic protothecosis. **Int J Syst Evol Microb.** v. 66, p. 1510–1520, 2016.

MAYORGA, J.; BARBA-GÓMEZ, J. F.; VERDUZCO-MARTÍNEZ, A. P.; MUÑOZ-ESTRADA, V. F.; WELSH, O. Protothecosis, **Clin Dermat**, 30, 432–436, 2012.

MCDONALD J.S., RICHARD J.L., ANDERSON A.J.: Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infections. **Amer J Vet Research**, 45, 1079-1080, 1984.

MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; SCHUCH, L. F. D.; ANTUNES, T. Á.; XAVIER, M.O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. **Brazilian J Pharmac Scie.** vol. 43, n. 1, jan./mar., 2007.

MEINKE, K. W.; HAMEDANI, F.; WU, S.; BALLA, A.; GUZMAN, G. *Prototheca zopfii* associated diverticulitis in an immunosuppressed host, a case presentation and literature review. **Hum Pathol: Case Reports** 10, 43–45, 2017.

MELVILLE, P.A.; WATANABE, E.T.; BENITES, N.R.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; GARINO, JR. F.; COSTA E.O. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. **Mycopathologia** 146:79-82, 1999.

MILANOV, D.; PETROVIĆ, T.; POLAČEK, V.; SUVAJDŽIĆ, L.; BOJKOVSKI, J. Mastitis associated with *Prototheca zopfii* - an emerging health and economic problem on dairy farms. **J Vet Research**, 60, 373-378, 2016.

MOELLER, A.; TRUYEN, U.; ROESLER, U. *Prototheca zopfii* genotype 2 – the causative agent of bovine protothecal mastitis? **Vet Microb.** v. 120, p. 370 – 374, 2007.

MONTEIRO, C., M. FERNANDES, M. PINHEIRO, S. MAIA, C. L. SEABRA, F. F. SILVA, F. COSTA, S. REIS, P. GOMES AND M. C. L. MARTINS. Antimicrobial properties of membrane-active Antimicrobial properties of membrane-active dodecapeptides derived from MSI-78. **Biochim Biophys Acta**. 1848:1139-46. 2015.

MORANDI, S.; CREMONESI, P.; CAPRA, E.; SILVETTI, T.; DECIMO, M.; BIANCHINI, V.; ALVES, A. C.; VARGAS, A. C.; COSTA, G. M.; RIBEIRO, M. G.; BRASCA M. Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. **J Dairy Sci**. Vol. 99 No. 8, 2016.

MORICI, P., R. FAIS, C. RIZZATO, A. TAVANTI AND A. LUPETTI. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by the synthetic lactoferricin derived peptide hLF1-11. **PLoS One**. 30:1-15, 2016.

NESHANI, A., H. ZARE, M. R. A. EIDGAHI, A. H. CHICHAKLU, A. MOVAQAR AND K. GHAZVINI. Review of antimicrobial peptides with anti-*Helicobacter pylori* activity. **Helicobacter**. e12555. 2018.

PORE, R. S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, v. 90, p. 129-139, 1985.

PORE, R.S.; SHAHAN, T.A.; PORE, M.D.; BLAUWIEKEL, R. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a Mastitis Pathogen, in Milk. **Vet Microb**. 15, 315-323, 1987.

REUK-NGAM, N.; CHIMNOI, N.; KHUNNAWUTMANOTHAM, N.; TECHASAKUL, S. Antimicrobial Activity of Coronarin D and Its Synergistic Potential with Antibiotics. **BioMed Research International**, 8 pages, 2014.

RODRIGUES, D. F.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; MARTINS, G. Z.; MAGALHÃES, N. O.; MARTINS, M. B. G.; CICARELLI, R. M. B.; MOREIRA, R. R. D. Chemical Composition and Trypanocidal Activity of the Essential Oils from *Hedychium coronarium* J. Koenig. (Zingiberaceae). **Infect Disea**, 6 pages, 2013.

ROESLER, U.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. Immunodiagnostic Identification of Dairy Cows Infected with *Prototheca zopfii* at Various Clinical Stages and Discrimination between Infected and Uninfected Cows. **J Clin Microb**. p. 539–543, 2001.

ROESLER, U.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. **Int J System Evol Microb**, v. 53, p. 1195–1199, 2003.

ROESLER, U.; MÖLLER, A.; HENSEL, A.; BAUMANN, D.; TRUYEN, U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. **Int J System Evol Microb**, v. 56, p. 1419–1425, 2006.

SATOH, K.; OOE, K.; NAGAYAMA, H.; MAKIMURA, K. *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. **Int J System Evol Microb**, v. 60, p. 1236–1240, 2010.

SHAHAN, T.A.; PORE, R.S. *In vitro* susceptibility of *Prototheca* spp. to gentamicin. **Antimicrob Agents Chemot.** 35(11):2434–5, 1991.

SHAHID, M.; ALI, T.; ZHANG, L.; HOU, R.; ZHANG, S.; DING, L.; HAN, D.; DENG, Z.; RAHMAN, A.; HAN, B. Characterization of *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cases of bovine mastitis and cow barns in China. **Mycopathologia** 181:185–195, 2016.

SOBUKAWA, H.; KANO, R.; ITO, T.; ONOZAKI, M.; MAKIMURA, K.; HASEGAWA, A.; KAMATA, I. *In vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. **Med Mycol.** 49, 222–224, February, 2011.

SPENCER, J. J., R. E. PITTS, R. A. PEARSON AND L. B. KING.. The effects of antimicrobial peptides wam-1 and LL-37 on multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Pathog. Dis.** 76:1-6, 2018.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária.** 5 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2014.

STALLMANN, H. P., C. FABER, E. T. SLOTEMA, D. M. LYARUU, A. L. J. J. BRONCKERS, A. V. N. AMERONGEN AND P. I. J. M. WUISMAN.. Continuous-release or burst-release of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11) from calcium phosphate bone substitutes. **J. Antimicrob. Chemoth.** 52:853–855, 2003.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Ciênc Tecn Alim.** v. 26, p. 41-45, 2006.

TAKANO, M.; HOSHI, S.; NAGAI, K.; ISHIDAIRA, H.; ONOZAKI, M.; SATOH, K.; MAKIMURA, K. The first case of human protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in Japan. **J Infect Chemot,** 20, 647-649, 2014.

TODD, J. R.; KING, J. W.; OBERLE, A.; MATSUMOTO, T.; ODAKA, Y.; FOWLER, M.; PORE, R. S.; SHAHAN, T. A.; YIN, L.; SANUSI, I. D. Protothecosis: report of a case with 20-year follow-up, and review of previously published cases. **Med Mycology,** 50, 673–689, October, 2012.

TOMASINSIG, L., B. SKERLAVAJ, M. SCARSINI, F. GUIDA, R. PICCININI, A. TOSSIB AND M. ZANETTIA. Comparative activity and mechanism of action of three types of bovine antimicrobial peptides against pathogenic *Prototheca* spp. **J. Peptide Sci.** 18:105-113, 2012.

TORTORANO, A. M.; PRIGITANO, A.; DHO, G., PICCININI, R.; DAPRA, V.; VIVIANI, M. A. *In vitro* activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. **J Ant Chemot,** 61, 1312–1314, 2008.

TSAI, P. W., C. Y. YANG, H. T. CHANG AND C. Y. LAN. Human antimicrobial peptide ll-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cellwall carbohydrates. **PLoS ONE.** 6:e17755, 2011.

YEAMAN, M.R. AND YOUNT, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol. Rev.** 55, 27–55, 2003.

YANG, D., Q. CHEN, A. P. SCHMIDT, G. M. ANDERSON, J. M. WANG, J. WOOTERS, J. J. OPPENHEIM AND O. CHERTOV. LL-37, the neutrophil granule–and epithelial cell–derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor–like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. **J. Exp. Med.** 192:1069–74, 2000.

WANG, J., K. MA, M. RUAN, Y. WANG, Y. LI, Y. V. FU, Y. SONG, H. SUN AND J. WANG. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. **PeerJ.** 6:e5369, 2018.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clevenger para extração de óleos essenciais. **Rev Fac Farmácia-Bioquímica**, v.1, p. 77-81, 1963.

WAWRON, W.; BOCHNIARZ, M.; PIECH, T.; WYSOCKI, J.; KOCIK, M. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. **B Vet Inst Pulawy** 57, 485-488, 2013.

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL I

22/02/2021

E-mail de Unicruz - Universidade de Cruz Alta - MYCO-D-21-00068 - Submission Confirmation



VITOR DA ROCHA SPEROTTO <vrocha@unicruz.edu.br>

MYCO-D-21-00068 - Submission Confirmation

1 mensagem

Mycopathologia (MYCO) <em@editorialmanager.com>

22 de fevereiro de 2021 07:26

Responder a: "Mycopathologia (MYCO)" <chitra.vijayaraghavan@springernature.com>

Para: Vitor Sperotto <vrocha@unicruz.edu.br>

Dear Mr Sperotto,

Thank you for submitting your manuscript, IN VITRO ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF ESSENTIAL OILS AND ANTIFUNGAL DRUGS ON *Prototheca bovis* ISOLATES, to Mycopathologia.

The submission id is: MYCO-D-21-00068
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the Editorial Manager website.

Your username is: vrocha
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/myco/>

Should you require any further assistance please feel free to contact the Editorial Office by clicking on the "contact us" in the menu bar to send an email to us.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Mycopathologia

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

****Our flexible approach during the COVID-19 pandemic****

If you need more time at any stage of the peer-review process, please do let us know. While our systems will continue to remind you of the original timelines, we aim to be as flexible as possible during the current pandemic.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/myco/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO



J. Dairy Sci. 104

<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18171>

© 2021 American Dairy Science Association®. Published by Elsevier Inc. and Fass Inc. All rights reserved.

Short communication: Algaecide activity of antimicrobial peptides compounds against *Prototheca bovis*

V. R. Sperotto,^{1,2*} L. B. Denardi,^{1,3} C. Weiblen,³ F. P. K. de Jesus,³ M. R. Dorneles,² L. B. Ianiski,^{3,4} and J. M. Santurio^{1,3}

¹Pharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 97105-900

²University of Cruz Alta, Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil, 98005-972

³Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900

⁴Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 97105-900

ABSTRACT

This study evaluated the *in vitro* activity of antimicrobial peptides pexiganan (MSI-78), h-Lf1-11, LL-37, cecropin B, magainin-2, and fengycin B against the veterinary mastitis agent *Prototheca bovis*. The results showed that pexiganan, h-Lf1-11, LL-37, and cecropin B were able to inhibit the growth and had effect on algaecide *P. bovis* isolates (n = 32). The minimum inhibitory concentration ranged from 5 to 10 µg/mL for pexiganan, and algaecide effect was detected from 5 to 20 µg/mL. The minimum inhibitory concentration ranged from 10 to 80 µg/mL for h-Lf1-11, 20 to 80 µg/mL for LL-37, and 40 to 160 µg/mL for cecropin B. These findings present a promising and novel alternative for *P. bovis* treatment and growth control.

Key words: protothecosis, antimicrobial peptides, h-Lf1-11, cecropin B

Short Communication

In veterinary medicine, *Prototheca bovis* is the main causative agent of bovine mastitis, an achlorophyllous algae classified as a new taxonomic form of *Prototheca zopfii* (genotype 2; Roesler et al., 2006; Jagielski et al., 2019). Mastitis caused by *P. bovis* is becoming endemic worldwide, due to poor environmental conditions, insufficient milking hygiene, and contagion forms between animals (Moroni et al., 2018).

As algae is the etiological agent, no specific drugs are available for control, and antifungals are implied. Because there are few alternatives available besides amphotericin B and azole derivatives, research on new drugs has been stimulated. The literature points out new compounds with *in vitro* action against algae, such as guanidine, iodopropynyl butylcarbamate, and silver

nanoparticles (Alves et al., 2017; Jagielski et al., 2017a, 2018). Within this context, a new group of compounds known as antimicrobial peptides (AMP) emerges as a possible alternative, demonstrating an antimicrobial effect against multiresistant microorganisms (Ebbensgaard et al., 2015; Kang et al., 2017; Ciandrini et al., 2018).

Antimicrobial peptides are a group of small innate immune molecules that have generally short amino acid sequences, positive charge, and amphiphilic properties, which have been recently studied due to their antimicrobial activities. They have been isolated from many animals, plants, and microorganisms, in addition to being chemically synthesized (Patel and Akhtar, 2017). The antimicrobial mechanism of AMP has been recognized for its action on the membrane of microorganisms, altering its permeability and acting on intracellular targets (Lee et al., 2016).

In previous studies, these compounds showed action against gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts, and filamentous fungi (Phoenix et al., 2013; Kang et al., 2017; Spencer et al., 2018). The activity of bovine AMP such as Bac5 and BMAP-28 against *Prototheca* spp. has already been demonstrated (Tomasiński et al., 2012); however, there are still very few studies that evaluated AMP activity against this pathogenic alga.

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial action of 6 AMP that showed some previous antimicrobial activity, namely MSI-78 (pexiganan), h-LF1-11, cecropin B, LL-37, magainin-2, and fengycin B, against isolates of *P. bovis*. *In vitro* tests were performed to evaluate the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum algaecide concentrations (MAC).

Six different AMP were acquired and evaluated for anti-*Prototheca* activity, including h-LF1-11, MSI-78, LL-37, fengycin B, magainin-2, and cecropin B. The compounds were purchased in powder form from the Chinese company GL Biochem (Shanghai) Ltd. (Shang-

Received January 7, 2020.

Accepted October 16, 2020.

*Corresponding author: vrocha@unicruz.edu.br